

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MARIA CECÍLIA DE LIMA RORIG**

**USO DE PIMECROLIMUS 0,5% NO TRATAMENTO DA  
CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

**CURITIBA**

**2009**

**MARIA CECÍLIA DE LIMA RORIG**

**USO DE PIMECROLIMUS 0,5% NO TRATAMENTO DA  
CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES**

**Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Antônio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk**

**CURITIBA**

**2009**

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho a todos os animais de companhia, que tornam nossas vidas mais prazerosas e que merecem todo o nosso respeito e admiração.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a DEUS, por me proporcionar saúde e me guiar durante todos esses anos, sem ELE não chegaria até aqui.

Agradeço às amigas Vanessa Yuri de Lima e Eliane Yorinori pelo incentivo nos momentos em que achei que não seria capaz.

Ao meu esposo Beto, por entender os motivos de tantas viagens e ausências.

Aos amigos e colegas de profissão Olicies da Cunha e Fernanda Rosalinski pelas contribuições na realização deste trabalho.

Aos meus pais, pelo contínuo incentivo e motivação nos momentos de cansaço.

Aos meus queridos alunos Pandýá, Michele, Karine e Aquiles, pelo auxílio na obtenção dos dados.

Ao meu orientador Antônio Felipe Wouk pela dedicação paciência e pelos ensinamentos que me acompanharão por toda a vida.

À empresa Ophtalmos pelo apoio sempre presente.

Aos proprietários e seus cães. Sem eles, não seria possível a realização desse projeto.

A todos aqueles que de alguma maneira tiveram participação na realização deste trabalho.

## LISTA DE SIGLAS

BUT – Breakup time  
CCS – Ceratoconjuntivite seca  
CsA – Ciclosporina A  
CSI - Cocker Spaniel Inglês  
DEWS – International Dry Eye Workshop  
FCT – Fator de crescimento tumoral  
FNT – Fator de necrose tumoral  
IFN – Interferon  
Ig – Imunoglobulina  
IL – Interleucina  
MHC – Complexo de histocompatibilidade principal  
NK – Natural killer  
pH - Potencial hidrogeniônico  
SILIC - Síndrome lacrimal imunomediada canina  
SRD - Sem raça definida  
TGF – Tumoral Growth Factor  
TLS – Teste lacrimal de Schirmer  
TLS I – Teste lacrimal de Schirmer tipo I  
TLS II – Teste lacrimal de Schirmer tipo II  
TRFL – Tempo de ruptura do filme lacrimal  
RNA - Ácido ribonucéico  
PMC - Plimecrolimus

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

® - marca registrada

% - porcentagem

$\alpha$  - alfa

$\beta$  - beta

mm – milímetro

cm – centímetro

min - minuto

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2 CERATOCONJUNTIVITE SECA – CCS</b>	11
<b>2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO SISTEMA LACRIMAL</b>	13
<b>2.2 ETIOPATOGENIA</b>	17
<b>3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA SUPERFÍCIE OCULAR</b>	23
<b>3.1 MECANISMOS DE IMUNIDADE INATA DA CÓRNEA</b>	23
<b>3.2 MECANISMOS DE IMUNIDADE ADQUIRIDA DA CÓRNEA</b>	25
<b>4 ACHADOS CLÍNICOS</b>	27
<b>5 DIAGNÓSTICO</b>	29
<b>5.1 TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER (TLS)</b>	30
<b>5.2 TEMPO DE RUPTURA DO FILME LACRIMAL (BREAK UP TIME - BUT)</b>	33
<b>6 PIMECROLIMUS</b>	36
<b>6.1 MECANISMO DE AÇÃO</b>	37
<b>7 TRATAMENTO</b>	41
<b>8 USO DO PIMECROLIMUS NA MEDICINA VETERINÁRIA</b>	43
<b>9 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	44
<b>9.1 LOCAL E ANIMAIS</b>	44
<b>9.2 OBTENÇÃO DA MOLÉCULA E MODO DE APLICAÇÃO</b>	46
<b>9.3 TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER (TLS)</b>	46
<b>9.4 TESTE DO TEMPO DE RUPTURA DO FILME LACRIMAL (TRFL)</b>	47
<b>9.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	47
<b>9.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	48
<b>10 CONCLUSÃO</b>	59
<b>REFERÊNCIAS</b>	61
<b>ANEXOS</b>	67

## USO DE PIMECROLIMUS 0,5% NO TRATAMENTO DA CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES

(THE USE OF PIMECROLIMO 0,5% IN THE TREATMENT OF  
KERATOCONJUNCTIVITIS SICCA IN DOGS)

RORIG, M.C.L.<sup>1</sup>., WOUK, A.F.P.F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestranda do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR

<sup>2</sup>Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária da UFPR

**RESUMO** - Não existem dúvidas de que o olho seco é uma doença importante e séria da superfície ocular, e que pode reduzir drasticamente a qualidade de vida do paciente. A ceratoconjuntivite seca (CCS), também chamada de “olho seco”, é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por uma produção deficiente de lágrima. As complicações oculares da ceratoconjuntivite seca afetam a superfície ocular provocando particularmente, vascularização, pigmentação e edema corneano. Pode ainda cursar com perda do epitélio da córnea, dor ocular e cegueira. Estudos comprovam que a maioria dos casos de ceratoconjuntivite seca em cães é resultado de distúrbios imunomediados, uma vez que os animais acometidos frequentemente exibem infiltração por células-T na glândula lacrimal e respondem à terapia imunossupressora com ciclosporina A. O tratamento normalmente utilizado para o olho seco é medicamentoso e inclui principalmente lacrimogênicos, lacrimomiméticos, mucolíticos e antibacterianos tópicos. Existem muitos avanços recentes no tratamento do olho seco. Uma nova droga imunossupressora, o pimecrolimus, pode ser uma alternativa no tratamento de pacientes com ceratoconjuntivite seca, que não respondem a ciclosporina A tópica. A molécula de pimecrolimus é um derivado ascomiceto que interfere seletivamente com a ativação de linfócitos T e mastócitos, inibindo a produção de citocinas inflamatórias. Com baixo peso molecular, liga-se ao receptor macrofilina-12, inibindo a calcineurina, com o conseqüente bloqueio da produção de interleucina -2 (tipos 1 e 2) e linfócitos T auxiliares. Estudos demonstram que esta droga é dez vezes mais efetiva do que a ciclosporina na inibição da produção de citocinas inflamatórias pelos

---

<sup>1</sup>Rua Almirante Barroso, 2546 Centro, 85900-020, Toledo – PR.  
maceciliavet@yahoo.com.br



linfócitos T. Desta forma, pimecrolimus é uma nova droga promissora no tratamento do olho seco em cães e em humanos. Objetivos: O presente estudo avaliou os efeitos do pimecrolimus a 0,5% (pomada oftálmica) sobre os componentes da lágrima no tratamento do olho seco em cães, por meio da observação de alterações oculares, teste de Schirmer e tempo de ruptura do filme lacrimal para estudo quantitativo e qualitativo da lágrima. Material e Métodos: Doze cães de diferentes raças e idades, com diagnóstico de ceratoconjuntivite seca, foram submetidos a tratamento com pimecrolimus pomada oftálmica a 0,5% e avaliados a cada sete dias, durante 23 semanas. As avaliações foram realizadas pelo teste lacrimal de Schirmer e tempo de ruptura do filme lacrimal. Resultados: Na avaliação da eficácia do pimecrolimus 0,5% em relação aos valores do teste lacrimal de Schirmer, os resultados mostraram diferença estatística significativa ( $p < 0,0001$ ) nos valores obtidos antes e depois do início do tratamento. A média na primeira semana foi igual a  $3,31 \pm 4,82$ mm, seguida pela média a partir da segunda semana igual a  $16,28 \pm 7,14$ mm. Conclusão: Os resultados do presente estudo sugerem que pimecrolimus 0,5% pode ser considerado como uma nova alternativa no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães. Mais estudos devem ser realizados especialmente para determinar a mínima dose terapêutica efetiva do pimecrolimus.

Palavras-chave : Pimecrolimus. Ceratoconjuntivite seca. Cães. Teste lacrimal de Schirmer. Ciclosporina.

**ABSTRACT** - There are no doubts that the dry eye is a serious and important disease of the ocular surface and it can drastically reduce the patient's quality of life. The Keratoconjunctivitis sicca (KCS), also known as "dry eye", is a chronic inflammatory disease characterized by a deficient tear production. The eyeball complications from keratoconjunctivitis sicca affect the eyeball surface provoking, specially, vascularization, pigmentation and corneal edema. It can also cause the loss of corneal epithelial, eyeball pain and blindness. Researches prove that most of the cases of keratoconjunctivitis sicca in dogs is the result of immunomediated disturbances, nonetheless animals frequently exhibit infiltration by T- cells in the lacrimal gland and answers to immunosuppressive therapy with cyclosporin A. The treatment normally used for dry eye is medicamentous and specially includes lachrymatories, lacrimomimetics, mucolytics and antibacterial topical. There are many recent advances in the dry eye treatment. A new immunosuppressive drug, the pimecrolimo, can be an alternative in the treatment of keratoconjunctivitis sicca patients that do not answer to topical cyclosporine A. The pimecrolimus molecule is a derived from ascomiceto that interferes selectively with the activation of T linfocytes and mastocytes, inhibiting the production of inflammatory citocinas. With low molecular weight, it links to macrofilina-12 receptor inhibiting the calcineurina with the consequently blockade of

interleucina – 2 production (types 1 and 2) and auxiliaries T linfocytes. Studies show that this drug is ten times more effective than cyclosporin in the inhibition of inflammatory cytokines production by T linfocytes. Therefore, pimecrolimus is a new drug for the dry eye treatment in dogs and human beings. Goals: The present paper evaluated the effects of pimecrolimo in 0,5% (ophthalmic ointment) about the tear components in the treatment of dry eye in dogs, through the observation of ocular alterations, Schirmer tear test, breakup time to the qualitative and quantitative study of tear.

Material and Methods: Twelve dogs from different breeds and ages, with a diagnostic of keratoconjunctivitis sicca, were undergone to the treatment with pimecrolimo ophthalmic ointment in 0,5% and evaluated in each seven days during 23 weeks. The evaluations were made by Schirmer tear test and breakup time of tear. Results: In the effectiveness evaluation of pimecrolimo in 0,5% in comparison to the values from Schirmer tear test, the results showed significant statistic difference ( $p < 0,0001$ ) in the values obtained before and after the beginning of the treatment. The average in the first week was equal to  $3,31 \pm 4,82$ mm, followed by the average of the beginning of the second week that was equal to  $16,28 \pm 14$ mm. Conclusion: The results on this paper suggest that pimecrolimo 0,5% can be considered as a new alternative drug in the keratoconjunctivitis sicca treatment in dogs. More researches may be made specially to determine the minimum effective therapeutic dose of pimecrolimo.

Key-words: Pimecrolimo. Keratoconjunctivitis sicca. Dogs. Schirmer tear test. Cyclosporine.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente as doenças do sistema lacrimal e nasolacrimal são comuns, e a deficiência de produção de lágrimas (ceratoconjuntivite seca – CCS) está entre as doenças mais frequentemente diagnosticadas na oftalmologia veterinária. Trata-se de uma oftalmopatia grave e progressiva que pode se tornar crônica e comprometer a visão (GELLAT, 2003; PIGATTO et al., 2007).

De acordo com Ofri et al. (2007), não surpreende o fato de que a deficiência de lágrimas é a maior causa de inflamação da córnea e da conjuntiva. Ele também afirma que milhões de pessoas em todo o mundo são acometidas por ceratoconjuntivite seca (CCS), ou olho seco, e os sintomas da doença são relatados por 17-25% dos pacientes atendidos nas clínicas

oftalmológicas. A doença também tem prevalência em cães e, cerca de 1 a 1,5% de todos os cães atendidos em hospitais veterinários da América do Norte têm o diagnóstico de ceratoconjuntivite seca.

Segundo Berdoly et al. (2005), a ceratoconjuntivite seca é uma doença resultante de deficiências no filme lacrimal pré-corneano. É uma enfermidade comum em pequenos animais, principalmente em cães e caracteriza-se pela diminuição da porção aquosa da lágrima, que resulta em ressecamento e inflamação da córnea e da conjuntiva, desconforto ocular e diminuição da acuidade visual (PIGATTO et al., 2007).

O teste mais comumente utilizado para o diagnóstico do olho seco em cães é o teste lacrimal de Schirmer. Existem outras técnicas que mensuram a produção lacrimal, porém ainda não são utilizados rotineiramente na oftalmologia veterinária (BROWN et al., 1996).

Não existem dúvidas de que o olho seco é uma doença importante e séria da superfície ocular, e que pode reduzir drasticamente a qualidade de vida do paciente. Por ser uma doença complexa, com manifestações diversas em cada indivíduo, a necessidade de um tratamento voltado para cada paciente e caso é cada vez mais presente. O tratamento normalmente utilizado para o olho seco é medicamentoso e inclui principalmente lacrimogênicos, lacrimomiméticos, mucolíticos e antibacterianos tópicos (CAVALLET, 2007).

Existem muitos avanços recentes no tratamento do olho seco. Algumas novas drogas imunossupressoras, como o tacrolimus e o pimecrolimus encontram-se em estudo e têm demonstrado resultados promissores (HERRERA, 2008).

O presente estudo objetiva avaliar os efeitos do pimecrolimus a 0,5% (pomada oftálmica) no tratamento de cães com ceratococonjuntivite seca.

## **2 CERATOCONJUNTIVITE SECA – CCS**

A ceratoconjuntivite seca é uma doença multifatorial que envolve a lágrima e a superfície ocular, e que resulta em sinais de desconforto,

dificuldade visual e danos severos à superfície ocular. A doença é acompanhada pelo aumento na osmolaridade do filme lacrimal e inflamação da superfície ocular (DEWS, 2007).

Caracterizada por ser uma oftalmopatia progressiva, crônica e potencialmente prejudicial à visão, a Síndrome do Olho Seco provoca um complexo de sinais clínicos causados pela anormalidade da película lacrimal pré-corneana e conjuntival (DAVIDSON ; KUONEN, 2004; PIGATTO et al., 2007; CABRAL et al., 2005).

A maioria dos casos de ceratoconjuntivite seca é considerada idiopática e associada à diminuição da porção aquosa da lágrima, relacionada a doença imunomediada. A ceratoconjuntivite seca também pode estar relacionada a doenças metabólicas, cinomose, terapia sistêmica com sulfas, remoção da glândula da terceira pálpebra, entre outras causas (PIGATTO et al., 2007; RIIS, 2005).

As anormalidades do filme lacrimal em cães podem ser classificadas quanto ao seu aspecto quantitativo, qualitativo ou ambos, sendo comumente observada na prática cotidiana. Alterações na produção de um ou mais componentes do filme lacrimal estão relacionadas a doença ocular em graus variados, denominada ceratoconjuntivite seca (LAUS et al., 2008). O filme lacrimal tem uma espessura de aproximadamente 35 a 45  $\mu\text{m}$  e pode ser separado em três camadas distintas: camada lipídica, camada aquosa e camada de mucina (GOMES, 2000; HARTLEY et al., 2006; CULLEN et al., 2005; McCULLEY et al., 2006; CABRAL et al., 2005).

Segundo Laus et al. (2008), a ceratoconjuntivite seca, também chamada de “olho seco”, é uma doença inflamatória crônica, caracterizada pela deficiência de produção da porção aquosa do filme lacrimal (deficiência quantitativa). A evaporação excessiva da lágrima (deficiência qualitativa) é resultado de produção inadequada da camada lipídica. Ambas são caracterizadas por danos à superfície da córnea e conjuntiva, o que desencadeia sinais clínicos de desconforto ocular, que variam de acordo com a severidade do caso.

Casos problemáticos de ceratoconjuntivite seca podem ocorrer, nos quais o volume aquoso da lágrima parece ser adequado e outras causas conhecidas de doenças da superfície (por exemplo, infecção, irritação por fricção, piscar não efetivo) tenham sido excluídas. Nestes casos, deficiência qualitativa da lágrima por anormalidade no componente lipídico ou mucoso podem ser causas primárias (ou contribuintes) da doença da superfície ocular (GELLAT, 2003; LAUS et al., 2008; CABRAL et al., 2005).

Gellat (2003), afirma que cães com distúrbios das glândulas tarsais ou meibomianas (camada lipídica do filme lacrimal) e das células caliciformes conjuntivais (camada de mucina do filme lacrimal) podem mostrar os sinais clínicos de ceratoconjuntivite seca, mas têm as medidas do teste lacrimal de Schirmer dentro da normalidade. Com doenças das glândulas tarsais, lipídios altamente polarizados são produzidos, o que quebra a superfície lipídica não polar do fluido lacrimal. A perda resultante da cobertura oleosa normal permite a dispersão prematura da camada aquosa. A produção insuficiente da mucina pré-ocular também resulta na perda da estabilidade do filme lacrimal, com subsequente ressecamento corneano. De acordo com Köstlin et al. (1998), as alterações inflamatórias da glândula lacrimal (dacrioadenite) levam à redução ou até mesmo à ausência da camada aquosa.

## **2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO SISTEMA LACRIMAL**

Segundo Gellat (2003), o filme lacrimal pré-ocular é composto de um fluido trilaminar complexo contendo componentes lipídico, aquoso e mucoso. A camada lipídica possui como funções retardar a evaporação da lágrima e estabilizar o filme lacrimal (GOMES, 2000; McCULLEY et al., 2006; HARTLEY et al., 2006), produzir uma superfície óptica plana e prevenir a contaminação do filme lacrimal por corpos estranhos e restos celulares. A fina camada lipídica superficial é secretada pelas glândulas tarsais (ou meibomianas) (DAVIDSON; KUONEN, 2004). De acordo com Slatter (2005), o filme pré-corneano é uma

camada de proteção essencial, cujo desaparecimento resulta em graves alterações à córnea e conjuntiva. Segundo Moore (1999) existe uma estreita relação entre os componentes do filme lacrimal, sendo que alterações quantitativas ou qualitativas destes componentes podem alterar a dinâmica do mesmo, comprometendo a sua função.

O componente intermediário ou aquoso das lágrimas dos cães é secretado pelas glândulas lacrimais da órbita e da terceira pálpebra. A porção aquosa é o componente em maior quantidade na lágrima, constituída de água, eletrólitos, glicose, uréia, polímeros de superfície ativos, glicoproteínas e proteínas lacrimais, incluindo lactoferrina e algumas proteínas séricas. Proteínas lacrimais primárias compreendem as globulinas, a albumina e a lisozima. A camada lacrimal mais profunda (camada mucosa) contém mucina, uma glicoproteína hidratada produzida pelas células caliciformes conjuntivais, que ancora as imunoglobulinas e a lisozima; além disso, auxilia na lubrificação e hidratação da conjuntiva e da córnea (FIGURA 1) (GOMES, 2000; DAVIDSON; KUONEN, 2004; McCULLEY et al., 2006; HARTLEY et al., 2006). No cão, a camada mucosa tem maior densidade no fórnice conjuntival. A mucina pré-ocular derivada das células caliciformes preenche qualquer irregularidade da superfície corneana, assim, fornece uma superfície ocular opticamente lisa, além de aprisionar bactérias e várias partículas estranhas (GELLAT, 2003; SLATTER, 2005; HERRERA, 2008).

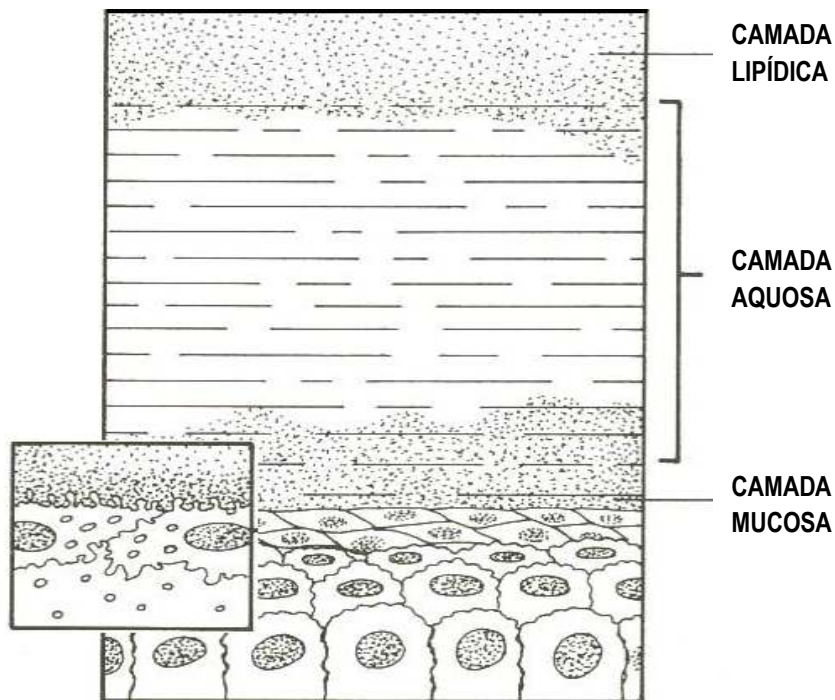


FIGURA 1 - Camadas componentes do filme lacrimal. No detalhe, a produção de mucina por células conjuntivais.

FONTE: PFEIFFER; PETERSEN (1997), modificado por RORIG (2008).

As alterações inflamatórias da glândula lacrimal (dacrioadenite) levam à redução ou até mesmo à ausência da camada aquosa. A blefarite crônica promove redução da camada de lipídeos, enquanto abrasões ou deficiências de vitamina A, causam efeitos na camada mucosa (KÖSTLIN et al., 1998).

O filme lacrimal é responsável pela lubrificação da superfície ocular e das pálpebras e pela nutrição da córnea, auxiliando na distribuição de leucócitos e na limpeza da superfície ocular (GRAHN; STOREY, 2004; SLATTER, 2005; FENNER, 2003).

As glândulas lacrimais da órbita e da terceira pálpebra são tubuloacinares e histopatologicamente similares. No cão, três a cinco ductos da glândula lacrimal orbitária abrem-se no fórnice conjuntival dorsolateral, enquanto a glândula da terceira pálpebra libera as lágrimas aquosas na superfície corneana através de múltiplos ductos entre os folículos linfóides na face interna da terceira pálpebra. A glândula lacrimal orbitária é a principal

fonte de lágrimas em alguns cães, enquanto para outros, a mesma função é exercida pela glândula da terceira pálpebra (GELLAT, 2003; SLATTER, 2005; CABRAL et al., 2005). (FIGURA 2)

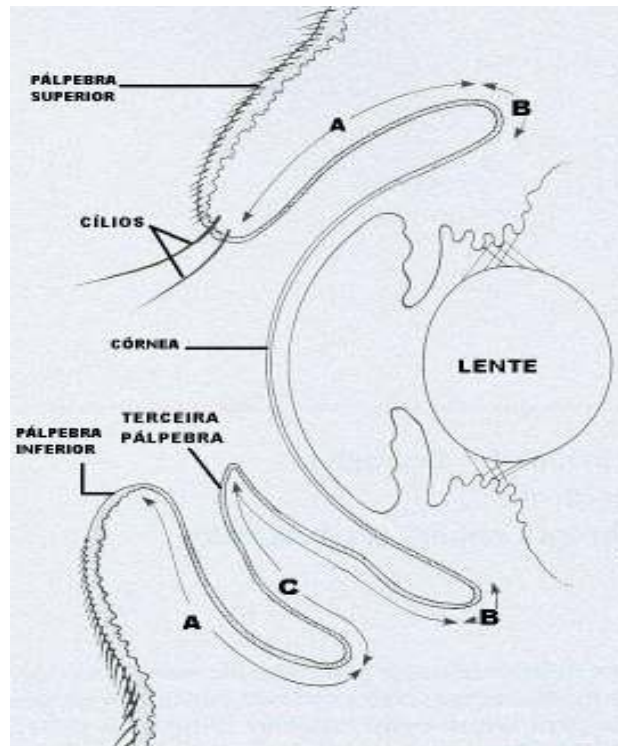


FIGURA 2 - Localização das glândulas lacrimais.  
A = Glândulas tarsais; B = Glândulas orbitárias; C = Glândula da terceira pálpebra.

FONTE: SLATTER (2005), modificado por RORIG (2008).

A inervação da glândula lacrimal e o controle de secreção são complexos com os detalhes exatos ainda não determinados em animais domésticos. Fibras provenientes da divisão oftálmica dos nervos trigêmeo e facial, gânglio pterigopalatino e fibras simpáticas do plexo carotídeo direcionam-se à glândula lacrimal (SLATTER, 2005).

Segundo Cabral et al. (2005), o sistema lacrimal é constituído por componentes secretório e excretório, que são responsáveis pela produção e excreção do filme lacrimal, respectivamente.



Histologicamente as glândulas lacrimais são constituídas por unidades secretórias, ductos e tecido conjuntivo de sustentação. Os componentes epiteliais (ductos e unidades secretórias) compõem o parênquima glandular. Tecido conjuntivo, incluindo vasos sanguíneos e fibras nervosas, compõe o estroma glandular (CORMACK, 1996).

Em estudo realizado por Cabral et. al. (2005), a porcentagem de parênquima secretório (acinar e tubular) em fêmeas caninas é comparativamente menor do que nos machos. Evidenciou-se também nesse estudo uma maior porcentagem de infiltrados linfocitários nas glândulas lacrimais das fêmeas. Isso poderia justificar a maior incidência de ceratoconjuntivite seca em fêmeas caninas, entre outras razões.

## **2.2 ETIOPATOGENIA**

Segundo Smith (2005), estudos sugerem que a maioria dos casos de ceratoconjuntivite seca em cães é resultado de alterações imunomediadas e que os animais afetados exibem frequentemente glândulas lacrimais infiltradas por linfócitos T e são responsivos a terapia imunossupressora como a ciclosporina A. De acordo com Andrade e Laus (1998) e Pigatto et al. (2007), a maioria dos casos de ceratoconjuntivite seca em cães é de caráter idiopático e são ligados à diminuição da porção aquosa da lágrima. No homem, os principais fatores etiológicos da ceratoconjuntivite seca são mostrados na figura 3.

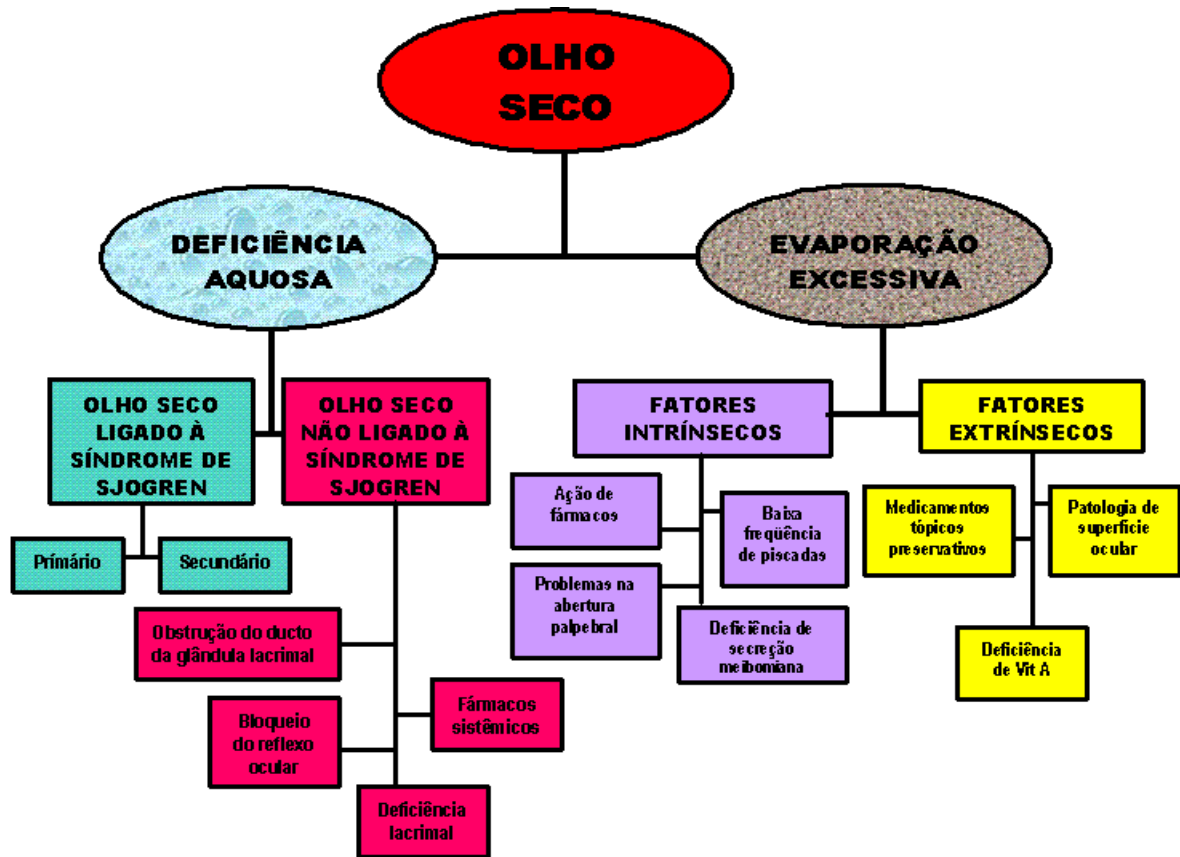


FIGURA 3 - Principais fatores etiológicos do olho seco.

FONTE: DEWS (2007), modificado por RORIG (2008).

Os pacientes com olho seco possuem a osmolaridade do filme lacrimal maior do que em pacientes normais. Esse aumento na osmolaridade causa mudanças morfológicas e bioquímicas no epitélio da córnea e da conjuntiva (doença da superfície ocular), especialmente perda das células caliciformes (DEWS, 2007).

A osmolaridade do filme lacrimal pode aumentar através de qualquer anormalidade que cause aumento na evaporação da lágrima ou diminuição na secreção da mesma. Isso gera uma alta concentração de eletrólitos na superfície ocular (FRIDMAN et al., 2004; BARABINO et al., 2004). A hiperosmolaridade causa danos ao epitélio da superfície corneana por aumentar a osmolaridade das células epiteliais e pela ativação de eventos da

cascata inflamatória na superfície ocular, com liberação de fatores inflamatórios (citocinas) na lágrima (DEWS, 2007).

O dano epitelial, causado pela liberação de fatores inflamatórios devido à hiperosmolaridade lacrimal, estimula as terminações nervosas da córnea, levando a sintomas de desconforto ocular, aumento do ato de piscar e secreção lacrimal reflexa compensatória. A secreção reflexa é encarada como um mecanismo compensatório inicial, mas com o tempo, a inflamação que acompanha a disfunção secretória crônica e a diminuição na sensação corneana, comprometem a resposta reflexa, tendo como consequência maior a instabilidade do filme lacrimal. Esse aumento da secreção lacrimal reflexa tem sido sugerido como a base da inflamação neurogênica no interior da glândula lacrimal. Esta inflamação causa tanto destruição tecidual como um bloqueio neurosecretório que pode ser potencialmente reversível (DEWS, 2007).

O olho seco pode ser desencadeado por uma grande variedade de causas que levam a um círculo vicioso ocasionando piora do quadro ocular (FIGURA 4). Um exemplo disso seria que todas as formas dessa síndrome causam perda das células caliciformes e desta forma ocorre um agravamento na perda da estabilidade do filme lacrimal, evaporação da água da superfície ocular, danos ao epitélio corneano e sintomas associados à falta de lubrificação corneana, além de eventos inflamatórios na superfície ocular (DEWS, 2007).

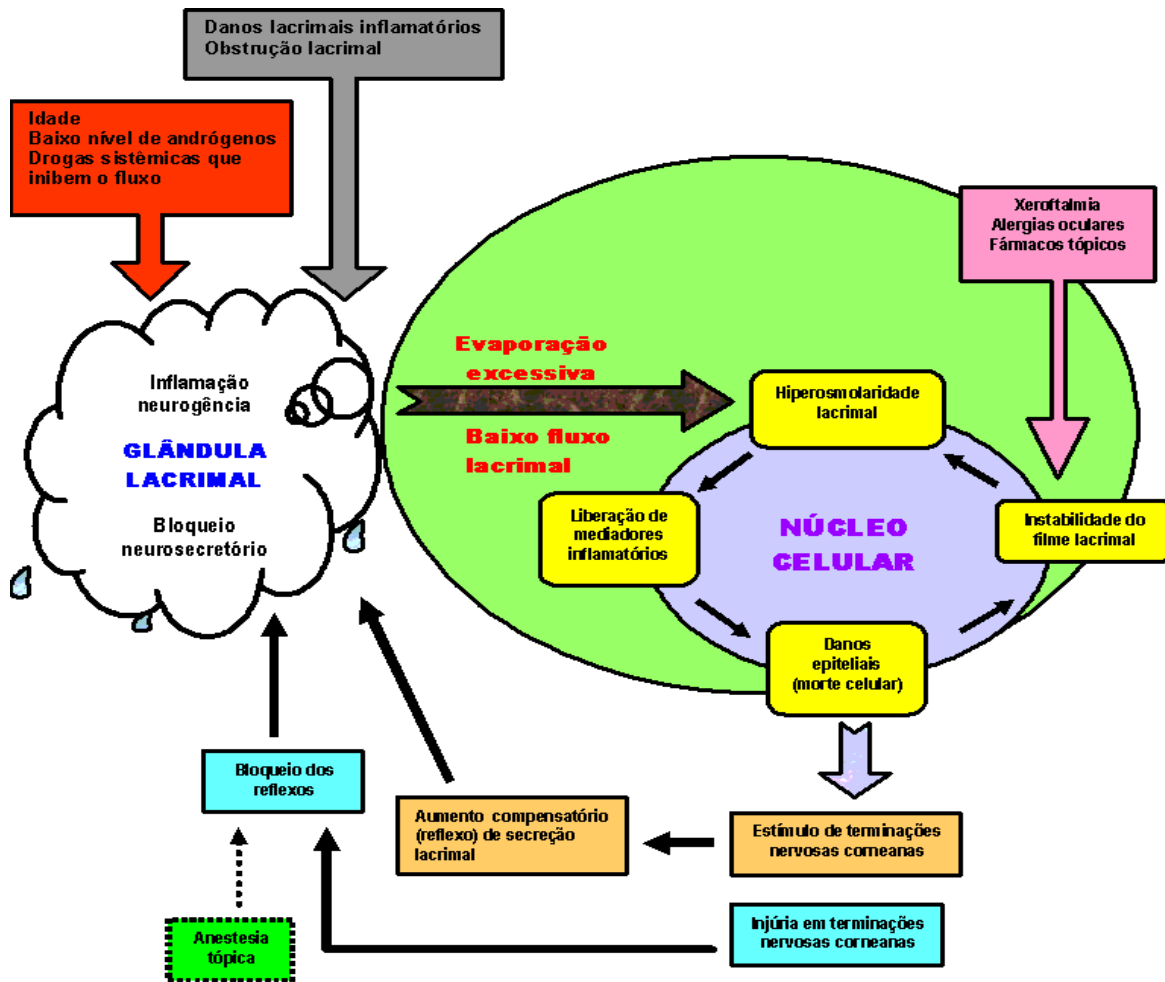


FIGURA 4 - Mecanismo do olho seco ilustrando a relação entre a hiperosmolaridade e a instabilidade do filme lacrimal.

FONTE: DEWS (2007), modificado por RORIG (2009).

Um novo conceito para a patogenia da ceratoconjuntivite seca em humanos foi postulado. De acordo com essa proposta, as células epiteliais da conjuntiva secretam regularmente antígenos e proteínas celulares. Em situações normais, esses antígenos são reconhecidos por células apresentadoras de antígenos e desta forma apresentam a linfócitos efetores presentes na superfície ocular. Ao mesmo tempo, linfócitos reguladores também ali presentes bloqueiam a ação dos linfócitos efetores mantendo a imunomeostase local (SMITH, 2005). Acredita-se que esse mecanismo é

modulado por andrógenos que são responsáveis por regular a produção do fator de crescimento *B* (TGF- *B*). Os andrógenos circulantes são supostamente indutores do acúmulo de citocinas antiinflamatórias nas glândulas lacrimais (DEWS, 2007). Algumas condições como a senilidade e fatores idiopáticos podem reduzir a produção de andrógenos, o que leva a mudanças na imunomeostase da conjuntiva, pela redução na produção de TGF-*B*. Isso altera a detecção local de antígenos, favorecendo a atuação dos linfócitos efetores e desta forma desencadeando a inflamação local (SMITH, 2005, BREWITT; SISTANI, 2001; FRIDMAN et al., 2004).

Outras causas de ceratoconjuntivite seca estão relacionadas a dacrioadenite imunomediada, infecção pelo vírus da cinomose, hipoplasia acinar congênita, blefarconjuntivite crônica, protrusão da glândula da terceira pálpebra, lesões traumáticas, uso de drogas como as sulfonamidas, remoção da glândula da terceira pálpebra, lesão de nervo facial, doenças metabólicas como hipotireoidismo e hiperadrenocorticismismo, radioterapia, entre outras (LAUS et al., 2007; HARTLEY et al., 2006).

Segundo Rothschild et. al. (2004), a produção de lágrimas em cães pode diminuir com o uso sistêmico de sulfas, desencadeando a ceratoconjuntivite seca. Em estudo realizado com 16 cães que receberam tratamento com sulfas durante 30 dias, 13 cães desenvolveram CCS. Outro estudo mostrou a ocorrência de cinco casos de ceratoconjuntivite seca, dentre 33 cães testados, que desenvolveram a doença dentro de uma semana após o início do tratamento, perdurando por meses após o término da terapia com sulfa. A toxicidade causada pelas sulfonamidas é normalmente associada a períodos prolongados de administração, entretanto, em um cão ocorreu o desenvolvimento de ceratoconjuntivite seca apenas três dias após o início do tratamento com esta droga. Ainda de acordo com Rothschild et. al. (2004) o efeito lacrimotóxico das sulfonamidas em cães ainda não está totalmente elucidado.

Descobriu-se que a anestesia pode causar diminuição da porção aquosa do filme lacrimal em animais como gatos, cães e cavalos (BRIGHTMAN, 1983). Em estudo realizado por Cullen et al. (2005) utilizando felinos, essa alteração

não foi clinicamente relevante, porém em cães foram registradas diminuições significantes na produção lacrimal por mais de 24 horas após o término da anestesia.

De acordo com Naranjo et al. (2005) descobriu-se através de imuno - histoquímica, que cães acometidos por leishmaniose desenvolvem ceratoconjuntivite seca devido ao parasitismo direto dos ductos lacrimais e das glândulas de meibômio. Ocorre uma dilatação dos ductos das glândulas lacrimais devido a inflamação piogranulomatosa ao redor destes, devido a presença de formas amastigotas que levam ao acúmulo e retenção de secreção.

Fridman et al. (2004) relatam que, em seres humanos, o fechamento noturno dos olhos constitui-se numa excelente barreira à evaporação, permitindo que, com o sono, o olho possa se recuperar. Com a abertura dos olhos ao despertar, a evaporação se reinicia e a osmolaridade lacrimal aumenta com o passar das horas, o que se associa com a frequente tendência de piora dos sintomas do olho seco ao final do dia.

Segundo Herrera (2008) no homem existe uma ceratoconjuntivite seca grave associada à síndrome de Sjögren, que é uma doença caracterizada por uma reação auto-imune nas glândulas salivares e lacrimais. Estudos sorológicos e histopatológicos realizados em cães revelaram achados similares àqueles que caracterizam a ceratoconjuntivite seca imunomediada humana.

A síndrome de Sjögren associa-se frequentemente com exocrinopatias auto-imunes poliglandulares como hepatite crônica, alterações intestinais, seborréia entre outros. Esses pacientes podem apresentar também poliartrites, alergia e hipotireoidismo. Em muitos cães com ceratoconjuntivite seca, a sequidade ocular está associada com seborréia ou atopia e, inclusive, alguns cães com CCS foram positivos ao fator reumatóide. Diante desses achados, a maioria dos casos de ceratoconjuntivite seca canina é considerada auto-imune e esta alteração deve ser considerada como uma síndrome (HERRERA, 2008).

### **3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA SUPERFÍCIE OCULAR**

No intuito de compreender a fisiopatologia da ceratoconjuntivite seca, alguns conceitos de imunologia ocular fazem-se obrigatórios. A superfície ocular encontra-se constantemente exposta a agentes externos, incluindo uma grande variedade de microorganismos, o que torna sua capacidade de reconhecimento de patógenos primordial na preservação da acuidade visual. Os mecanismos de defesa na superfície ocular ou olho externo podem ser classificados como inato ou inespecífico e adquirido ou específico (AKPECK ; GOTSH, 2003).

#### **3.1 MECANISMOS DE IMUNIDADE INATA DA CÓRNEA**

De acordo com Akpeck e Gotsch (2003), os mecanismos de imunidade inata constituem a primeira linha de defesa do organismo. Seus elementos constituintes estão presentes ao nascimento e fornecem um sistema de proteção inespecífico: lágrimas, nervos corneanos, epitélio, ceratinócitos, células polimorfonucleares e algumas citocinas, além das barreiras físicas como as pálpebras e os ossos da órbita ocular.

As lágrimas têm por funções a hidratação e lubrificação da córnea, eliminação de corpos estranhos, e transporte de proteínas antimicrobianas (por exemplo, lisozima) e imunoglobulinas (IgA em maior concentração, e IgG) (STREILEN, 2003).

As células epiteliais corneanas secretam citocinas que ativam o sistema imunológico, prevenindo os olhos de invasões bacterianas. A IL-1 $\alpha$  é liberada das células epiteliais, resultante de ruptura celular por trauma ou agentes infecciosos; sua secreção crônica pode levar à neovascularização e destruição da córnea devido ao aumento da resposta imunológica (ONO, 2003).

Ainda segundo ONO (2003), os ceratinócitos, sob influência de IL-1 $\alpha$  e do fator de necrose tumoral (FNT- $\alpha$ ), sintetizam a IL-6, que interage com a IL-1 $\alpha$  (talvez com o FNT- $\alpha$ ), e defensinas. Estas, presentes também em neutrófilos na conjuntiva, são moléculas com amplo espectro de atividade antimicrobiana e boa capacidade de reepitelização.

A função dos nervos corneanos, consiste no transporte de informações que levam a movimentos reflexos protetores do olho. Sensações de desconforto e dor podem liberar neuropeptídeos capazes de induzir atividade citocínica. Dois neuropeptídeos, a calcitonina e a substância P, liberados em terminações dos neurônios sensoriais corneanos em resposta à dor; podem induzir síntese de IL-8, com conseqüente influxo de neutrófilos ao local afetado (ONO, 2003)

Proteínas do sistema complemento depositam-se em maior quantidade na periferia da córnea, sendo capazes de ativar a via clássica ou alternativa nos processos inflamatórios locais (STREILEN, 1987). Interferons (IFN) são citocinas produzidas em resposta às infecções virais. Estimulam a produção do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I) e aumentam a habilidade de apresentação do antígeno aos linfócitos T. Dividem-se em IFN- $\alpha$ , que são secretados por leucócitos, IFN- $\beta$  por fibroblastos e IFN- $\gamma$  por linfócitos T e células natural killer (NK) ou matadoras naturais; os IFNs- $\alpha$  e  $\beta$ , são os responsáveis pela ativação de células NK cujos alvos são células infectadas (AKPECK ; GOTSCH, 2003).

As células envolvidas na imunidade inata da córnea são os neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células NK. Os neutrófilos são células vitais, realizando fagocitose e morte microbiana; os eosinófilos podem ser ativados pelas interleucinas 3 e 5 (IL-3 e IL-5) e fatores estimuladores de colônia de granulócitos na tentativa de eliminação de parasitas. Os macrófagos são encontrados na conjuntiva e estroma corneano, têm sua importância devido à atividade fagocítica e apresentadora de antígenos, bem como síntese das citocinas inflamatórias. As células NK são granulares e sem receptores de antígenos na superfície, reconhecem moléculas do complexo de histocompatibilidade principal I (MHC I) apresentadas em quantidade



insuficiente, fato que ocorre na superfície de células tumorais infectadas por vírus; e à semelhança dos macrófagos ativados, secretam FNT- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  (AKPECK ;GOTSCH, 2003).

### **3.2 MECANISMOS DE IMUNIDADE ADQUIRIDA DA CÓRNEA**

Os mecanismos de imunidade adquirida ou específica são ativados quando os mecanismos de imunidade inata não conseguem eliminar completamente os antígenos persistentes. A imunidade adquirida mediada por células mantém os antígenos sob controle, com possibilidades de desencadeamento de uma resposta desproporcional ao desafio antigênico, levando à destruição corneana irreversível, podendo levar uma perda visual significativa. Seus principais componentes são células apresentadoras de antígenos, principalmente as células de Langerhans, e as citocinas (ONO, 2003).

As células de Langerhans são as apresentadoras de antígeno da córnea, responsáveis pelo reconhecimento, processamento e apresentação dos antígenos em moléculas de MHC I ou MHC II em sua superfície, ligando-se respectivamente a células T citotóxicas ou T auxiliares (ou T helper), a fim de eliminar antígenos estranhos ou secretar citocinas responsáveis pela chegada das células efetoras destruidoras de patógenos e ativadoras de outras células inflamatórias (STREILEN, 1987).

Citocinas são proteínas sinalizadoras intercelulares (Tabela 1). Existem dois subgrupos de células T auxiliares (ou T helper), com padrões diferenciados de citocinas: as Ta1 (T auxiliares 1) secretam IL-2 e IFN- $\gamma$ , podem ser citolíticas e auxiliar as células B na síntese de IgG, IgM e IgA, enquanto as Ta2 (T auxiliares 2) secretam IL-4 e IL-5, não são citolíticas mas podem auxiliar as células B (ou linfócitos B) na síntese de IgG, IgM, IgA e IgE (ONO, 2003; STREILEN, 2003).

TABELA 1 - ATRIBUIÇÕES GERAIS DAS CITOCINAS NO ORGANISMO ANIMAL.

Citocina	Local de síntese	Principais funções
IL-1	Macrófagos e outras células	Fator inicial para resposta imune e inflamatória
IL-2	Linfócitos T, células NK	Indução da proliferação de linfócitos T e B; aumento da citotoxicidade dos linfócitos T e das células NK
IL-3	Linfócitos T	Indução do aumento e maturação de progenitores de células da medula óssea
IL-4	Linfócitos T	Estímulo da proliferação de linfócitos B e diferenciação de linfócitos Th2
IL-5	Linfócitos T	Ativação de eosinófilos; aumento da síntese de IgA e IgE
IL-6	Macrófagos e linfócitos T	Indução da diferenciação final e mudança de classe de linfócitos B; interação com IL-1 e TNF em fase aguda
IL-7	Células da medula óssea	Proliferação de linfócitos imaturos; indução da secreção de IL-2 e da formação de linfócitos T
IL-8	Linfócitos, neutrófilos e macrófagos	Quimiotaxia de neutrófilos estimula a liberação de neutrófilos granulares
IL-9	Linfócitos T	Proliferação e de linfócito Th; estímulo mastócitos em conjunção com IL-3
IL-10	Linfócitos T	Inibição da produção de IL-2 de linfócitos T/ macrófagos
IL-11	Células da medula óssea	Indução da proliferação de linfócitos B
IL-12	Monócitos, macrófagos e células dendríticas	Indução da diferenciação em linfócitos Th 1
TNF- $\alpha$	Macrófagos, linfócitos e células NK	Início inflamação aguda com IL-1 e IL-6; regressão de tumores; aumento da função de neutrófilos; proliferação de linfócitos T e B
IFN- $\gamma$	Linfócitos T e células NK	Intervenção no aumento da infecção viral; de função de macrófagos; de citotoxicidade linfócitos T e células NK; Afetam isotipos de Ac expressos pelos linfócitos B
TGF- $\beta$	Linfócitos B e T e macrófagos	Inibição da função dos macrófagos e da proliferação de linfócitos B e T; atração de monócitos e fibroblastos

FONTE: CLAUGH; ROTH (1997), modificado por RORIG (2008).

#### 4 ACHADOS CLÍNICOS

De acordo com Herrera (2008), a maioria dos cães com ceratoconjuntivite seca apresenta histórico de ceratoconjuntivite crônica, recorrente e inespecífica. A característica da enfermidade é a presença de secreção mucosa que faz com que os olhos aparentem uma conjuntivite bacteriana.

Para Gellat (2003) os sinais clínicos de ceratoconjuntivite seca variam dependendo do tempo decorrido do surgimento e extensão do ressecamento. Uma forma de CCS muito aguda e severa é algumas vezes vista, na qual o olho torna-se agudamente doloroso em associação com ulceração corneana axial. Nesses casos, uma inflamação supurativa pode resultar em doença corneana progressiva com malácia estromal, descemetocle com resultante estafiloma e prolapso de íris.

Na maioria dos casos, no entanto, o aparecimento é mais gradual, com a gravidade aumentando durante o período de várias semanas. Estes olhos aparecem inicialmente vermelhos e inflamados, com secreção mucóide ou mucopurulenta intermitente. Conforme a gravidade aumenta, a superfície ocular torna-se sem brilho, a conjuntiva fica extremamente hiperêmica e secreção mucopurulenta persistente é observada. Ceratite progressiva caracterizada por vascularização e pigmentação extensas com ou sem ulceração, pode também ocorrer (FIGURA 5). Ceratite pigmentar grave pode ser refratária à terapia médica e cirúrgica (FIGURAS 6 e 7). Blefarite e dermatite periocular, frequentemente ocorrem com o acúmulo de exsudatos nas margens palpebrais e na pele periocular. Com a progressão da doença, o desconforto se intensifica, resultando desta forma em blefaroespasmo persistente (GELLAT, 2003; SLATTER, 2005; HERRERA, 2008). Cegueira ou diminuição da acuidade visual são resultantes da densa opacificação corneana, ou perfuração da córnea, secundária à ulcerações profundas da mesma (BERDOULAY et al., 2005).



FIGURA 5 - Edema e vascularização da córnea.

FONTE: O autor (2007)



FIGURA 6 - Edema, vascularização e pigmentação na córnea de Cocker Spaniel Inglês, fêmea, 10 anos, com olho seco.

FONTE: O autor (2007).



FIGURA 7 - Secreção ocular mucopurulenta em cão com olho seco. Nota-se também hiperemia de esclera, vascularização e edema de córnea.

FONTE: O autor (2007).

É importante ressaltar que habitualmente existem sinais clínicos não oculares como algumas alterações cutâneas que frequentemente associam-se à ceratoconjuntivite seca. De acordo com dados próprios, mais de 90% dos Cocker Spaniels com olho seco apresentam seborréia e mais de 70% dos cães da raça Shih Tzu e Lhasa Apso com ceratoconjuntivite seca sofrem de atopia. Estes problemas afetam as pálpebras e produzem mudanças na composição do filme lacrimal pré-corneano (HERRERA, 2008).

## 5 DIAGNÓSTICO

De acordo com Hida et al. (2005), vários são os testes clínicos disponíveis para detectar anormalidades do filme lacrimal, porém, nenhum

pode ser considerado inteiramente eficiente. Entre os testes diagnósticos quantitativos, o mais utilizado é o teste lacrimal de Schirmer. Trata-se de um teste fácil, de baixo custo, porém, a colocação das fitas de papel causa desconforto, que pode ser minimizado com a utilização de anestésico tópico (SAITO; KOTANI, 2001; HARTLEY et al., 2006).

Em estudo realizado por Saito e Kotani (2001), no qual foram avaliados 14 beagles normais, foram realizados alguns testes para a avaliação do nível lacrimal, entre eles o teste lacrimal de Schirmer tipo I e o teste do fenol vermelho. Demonstrou-se com esse experimento que não há correlação entre os valores do teste do fenol vermelho e o teste lacrimal de Schirmer tipo I. Ainda segundo o autor, baseado nos achados deste experimento, sugere-se que os baixos níveis de secreção lacrimal basal (teste lacrimal de Schirmer tipo II) têm correlação com baixos valores do tempo de ruptura do filme lacrimal.

## **5.1 TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER (TLS)**

Segundo Willians (2005), o teste lacrimal de Schirmer permanece como teste padrão utilizado para avaliar a produção lacrimal em cães.

O teste lacrimal de Schirmer (TLS) é um método semi-quantitativo de mensuração da produção do filme lacrimal pré-corneano (SLATTER, 2005).

De acordo com Köstlin et al. (1998), a avaliação rotineira da produção lacrimal através do teste lacrimal de Schirmer é importante para não confundir ceratoconjuntivite seca inicial com conjuntivite purulenta, principalmente nos casos de conjuntivites resistentes ao tratamento.

Este teste é realizado com o uso de tiras de papel-filtro especiais, de venda comercial; cada uma delas possui em média 0,5 cm de largura e 4 cm de altura. Deve-se levar em consideração que estas tiras são comercializadas em envelopes esterilizados, contendo uma fita para cada olho e, desta forma, deve haver cuidado na sua manipulação a fim de evitar contaminações e

interferências na absorção da lágrima pela fita de papel, através da impregnação de gordura que recobre os dedos (HERRERA, 2008).

O teste lacrimal de Schirmer pode ser realizado sem (TLS I) ou com (TLS II) o uso de anestesia tópica. O TLS I mede a habilidade do olho em produzir lágrimas reflexas além das secreções basais e é o mais comumente utilizado, enquanto o TLS II mensura somente a secreção lacrimal basal (GELLAT, 2003).

O TLS I é influenciado pela lágrima residual (quantidade de lágrima previamente ao teste no saco conjuntival inferior), secreção lacrimal basal e secreção reflexa devido a irritação da córnea causada pela tira de papel (SAITO; KOTANI, 2001).

As tiras possuem um entalhe a 5mm de sua extremidade. Para a realização do teste, cada tira é dobrada nesse entalhe e introduzida na porção medial da pálpebra inferior durante um minuto como mostrado na figura 8. A distância do entalhe à extremidade umedecida do papel é mensurada imediatamente após a remoção da tira do olho (SLATTER, 2005).

Se a tira sair do lugar deve-se proceder a um novo teste, pois a umidade presente prosseguirá por capilaridade no papel de filtro, ocasionando resultados falso-negativos. Como as tiras são de papel padronizado (papel filtro Whatman nº 40), outros papéis como coadores de café não são confiáveis (CARNEIRO FILHO, 2004).





FIGURA 8- Realização do teste lacrimal de Schirmer tipo I, mostrando tira umedecida e escala em milímetros.

FONTE : O autor (2008)

No teste de Schirmer tipo I, a sensação corneana, incluindo a estimulação proveniente da presença da tira do teste, está preservada. No teste da lágrima de Schirmer tipo II, a sensação corneana fica abolida com o emprego de colírios anestésicos, resultando em valores menores do teste. Os anestésicos locais anestesiavam a córnea, bloqueiam o ramo aferente do reflexo e previnem a secreção reflexa pelas glândulas lacrimal e nictitante. Este teste tem pouca aplicação clínica em animais, mas frequentemente é referido na literatura (SLATTER, 2005; GELLAT, 2003; HERRERA, 2008; CABRAL et al. 2005)

Flutuações nos valores do teste lacrimal de Schirmer podem ocorrer diariamente; contudo, somente alterações semanais são consideradas biologicamente significantes (GELLAT, 2003).

Segundo Laus e Oriá (1998) drogas parassimpatolíticas e anestésicos locais reduzem a produção de lágrima. Não obstante, a manipulação do olho e a utilização da fluoresceína podem aumentar estes valores.

Os valores normais para o cão variam ao redor de 16 ou 17mm/min, embora a maioria dos autores considere como normais os valores superiores a



10mm/minuto (HERRERA, 2008). De acordo com Pigatto et. al. (2007) valores menores do que 15mm já podem ser sugestivos de olho seco.

De acordo com Hartley et. al. (2006), pesquisas confirmam que em cães ocorre um decréscimo anual no teste lacrimal de Schirmer de 0,4mm e que valores obtidos no período da manhã são em média 0,7mm menores do que valores obtidos ao final do dia.

Deve-se ressaltar que a enfermidade se inicia antes que os valores do teste lacrimal de Schirmer (TLS) se alterem, produzindo mudanças qualitativas na lágrima que podem ser associadas às primeiras alterações nas glândulas lacrimais, mesmo com os valores do TLS normais ou levemente diminuídos. Isso significa que a enfermidade deve ser considerada não unicamente como “olho seco”, mas como uma síndrome mais ampla com a primeira etapa com “olho úmido”, habitualmente mais difícil de ser diagnosticada e uma etapa característica de ceratoconjuntivite seca, facilmente identificável, devido aos sinais clínicos e ao TLS. Considerando que a denominação ceratoconjuntivite seca somente faz referência à etapa mais avançada da enfermidade, preferimos chamar esses casos de síndrome lacrimal imunomediada canina (SILIC) (HERRERA, 2008).

De acordo com Bron (2001), o teste lacrimal de Schirmer é útil para verificar a evolução da ceratoconjuntivite seca, embora não deva ser utilizado exclusivamente para a exclusão da mesma, por se tratar de um método diagnóstico que mensura apenas a produção lacrimal e não mostra nada a respeito das deficiências de mucina e lipídio no filme lacrimal pré-corneano.

## **5.2 TEMPO DE RUPTURA DO FILME LACRIMAL (BREAK UP TIME - BUT)**

De acordo com Herrera (2008), o tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) é o tempo em que filme lacrimal pré-corneano apresenta pontos de ressecamento logo após a instilação de fluoresceína.

O tempo de ruptura do filme lacrimal está supostamente relacionado à composição da camada lipídica do filme ou à natureza do filme corneano, podendo indicar anormalidades que poderiam causar perda do filme lacrimal e dessecação da córnea. O tempo de quebra não é útil se a superfície da córnea estiver irregular. Ele mostra-se efetivo em condições do filme lacrimal em que há umedecimento adequado (GELLAT, 2003; SLATTER, 2005; HERRERA, 2008) (FIGURA 9).

O diagnóstico clínico de deficiência de mucina ocular pode ser realizado através dos resultados do teste do tempo de ruptura do filme lacrimal. Este teste é realizado instilando-se uma gota de fluoresceína no olho e, então, manualmente, segurando as pálpebras abertas. O tempo é registrado a partir do último piscar, até o aparecimento do primeiro ponto seco, que surge como uma área escura no filme amarelo esverdeado de fluoresceína (FIGURA 10). Um filtro de azul cobalto deve ser utilizado no exame da córnea. O tempo de ruptura normal no cão deve ser 20 segundos ou mais. Contudo, no cão com deficiência de mucina, a ruptura ocorre em menos de 5 segundos (GELLAT, 2003; HERRERA, 2008). De acordo com Herrera (2008), um filme lacrimal de qualidade não deve formar um pontilhado visível de fluoresceína, num tempo inferior a 15 segundos. Valores menores do que 20 segundos sugerem ceratoconjuntivite seca quando associados a sinais clínicos da doença (BARABINO et al., 2004).

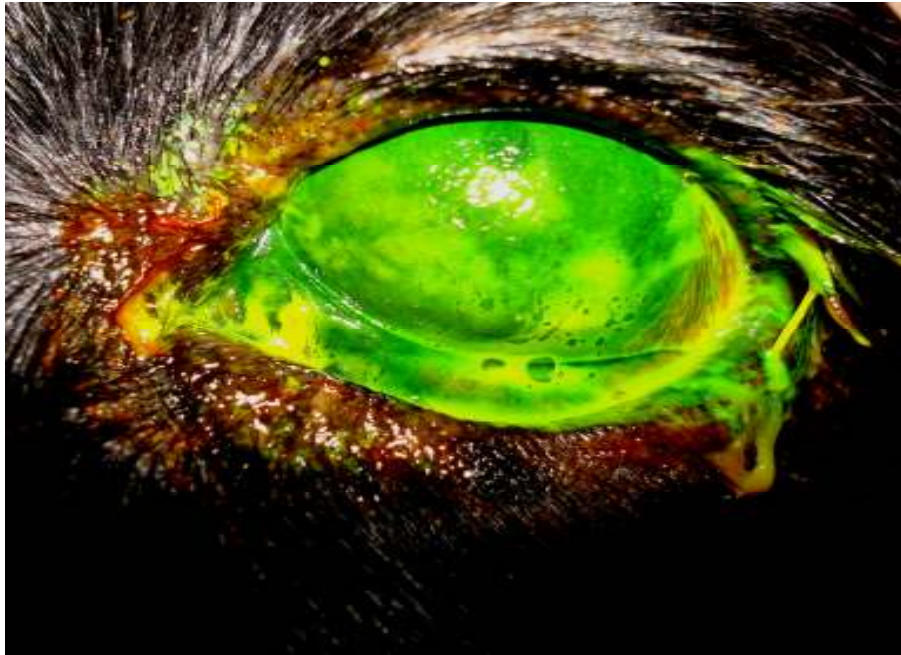


FIGURA 9- Filme de fluoresceína formado sobre a córnea com superfície Irregular.

FONTE: O autor (2008).

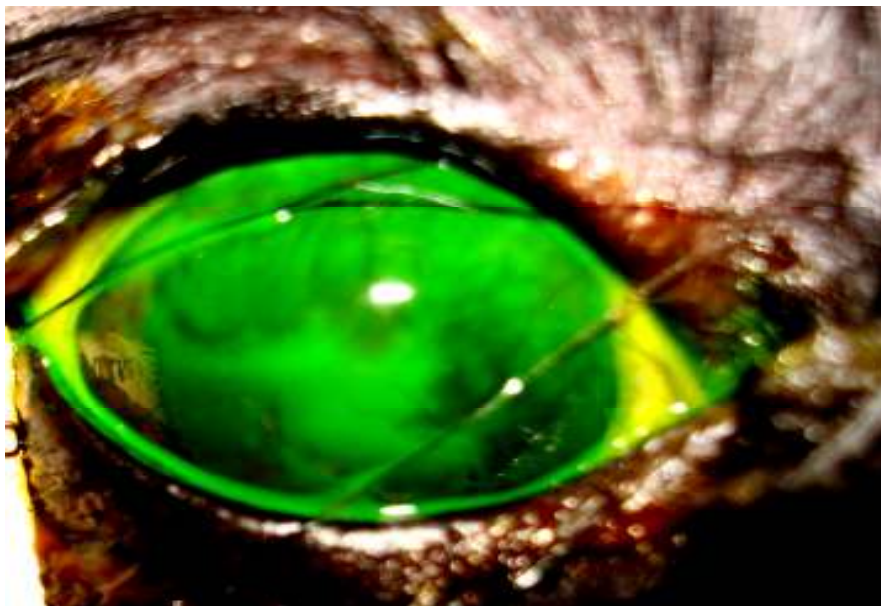


FIGURA 10 - Realização do teste do tempo de ruptura do filme lacrimal em cão com ceratoconjuntivite seca. Presença de falhas no filme esverdeado formado pela fluoresceína, que recobre a córnea.

FONTE: O autor (2007).

O tempo de ruptura do filme lacrimal (TRFL) é um teste diagnóstico não-invasivo que pode auxiliar no diagnóstico presuntivo de anormalidade qualitativa do filme lacrimal, uma vez que consiste na mensuração indireta do componente mucínico e/ou lipídico do filme lacrimal pré-corneano. Em cães normais, o valor do TRFL foi estabelecido como  $19,7 \pm 5$  segundos. Valores em torno de 2 a 5 segundos foram relatados em cães com deficiência de mucina e ceratoconjuntivite ulcerativa e não-ulcerativa (CULLEN, 2005). De acordo com Saito e Kotani (2001), os valores relatados foram  $21,53 \pm 7,42$  segundos.

## 6 PIMECROLIMUS

De acordo com Castro (2006), o pimecrolimus é um antiinflamatório derivado macrolactâmico da ascomicina, uma das substâncias produzidas pelo fungo *Streptomyces hygroscopicus*, e inibidor seletivo da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e mediadores em células T e mastócitos (FIGURA 11).

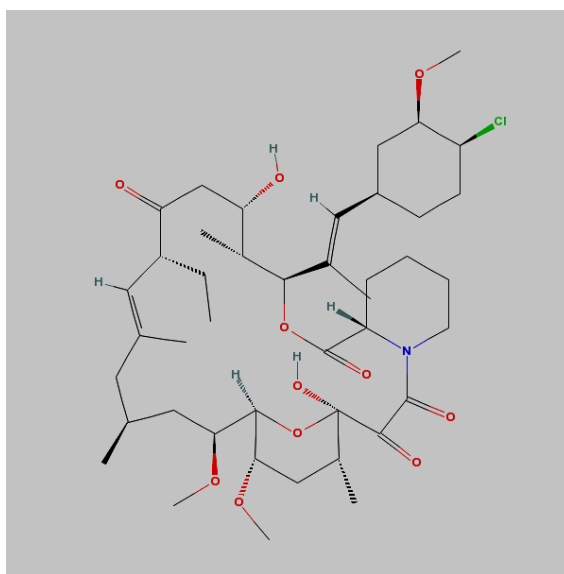


FIGURA 11 - Estrutura molecular do pimecrolimus.

FONTE: Pubchem (2008).

Os macrolídeos com propriedades imunossupressoras foram descobertos na década de 1980 e vêm sendo utilizados em patologias onde a principal lesão encontra-se relacionada a doenças auto-imunes, ou ao controle da rejeição de transplantes. Desde 1992, época em que começaram os primeiros estudos com esta classe de fármacos, observou-se sua capacidade de controle no processo inflamatório em diferentes afecções dermatológicas de caráter imunológico (MEINGASSER; STUTZ, 1992).

A inibição da calcineurina minimiza a ação do linfócito T de maneira bastante controlada, obtendo melhora do quadro inflamatório, sem o comprometer a função imunológica sistêmica (CASTRO, 2006; GUPTA; CHOW, 2003).

Os fármacos com capacidade de reduzir a ação da calcineurina inibem diferentes imunofilinas; dentre eles, encontra-se a ciclosporina, que possui características farmacológicas nas quais a via tópica não apresenta a eficácia desejada. Atualmente existem outros dois fármacos inibidores de calcineurina, eficazes e disponíveis para uso tópico: o pimecrolimus e o tacrolimus (MEINGASSER; STUTZ, 1992; HERRERA, 2008).

## **6.1 MECANISMO DE AÇÃO**

Segundo Monte (2006), os inibidores da calcineurina (ciclosporina, tacrolimus e pimecrolimus), compartilham do mesmo mecanismo de ação molecular, baseado na sua capacidade de bloquear a atividade de fosfatase da calcineurina depois de se ligar aos seus respectivos co-fatores citoplasmáticos. Essa ligação bloqueia a transdução da mensagem para o núcleo e a síntese de genes dependentes de fator ativador de transcrição nuclear.

Castro (2006), afirma que a ação imunomoduladora do pimecrolimus, semelhante aos demais macrolídeos, resulta de sua ligação por alta afinidade à macrofilina-12; este complexo então se liga à enzima citosólica calcineurina fosfatase.

A calcineurina é uma molécula protéica cálcio-calmodulina dependente de fosfatase, que regula a translocação dos componentes citosólicos nos fatores nucleares (NF), que por sua vez, regulam as atividades promotoras de vários mediadores pela transcrição do RNA mensageiro (RNAm). Com a Inibição da ação da calcineurina, o complexo pimecrolimus/ macrofilina-12 previne a desfosforilação de componentes citoplasmáticos do fator nuclear de células T ativadas (NF-AT) e este, regula a transcrição de RNAm de várias citocinas inflamatórias, bloqueando pela ação do pimecrolimus, a transcrição das seguintes citocinas produzidas pelas células Ta1: IL-2, IFN- $\gamma$  e Ta2: IL-1 e IL-10 (Figura 5b). A IL-5, IL-10 e TNF- $\alpha$ , têm sua produção diminuída proporcionalmente à concentração de pimecrolimus presente (GUPTA; CHOW, 2003). O esquema é mostrado nas figuras 13a e 13b.

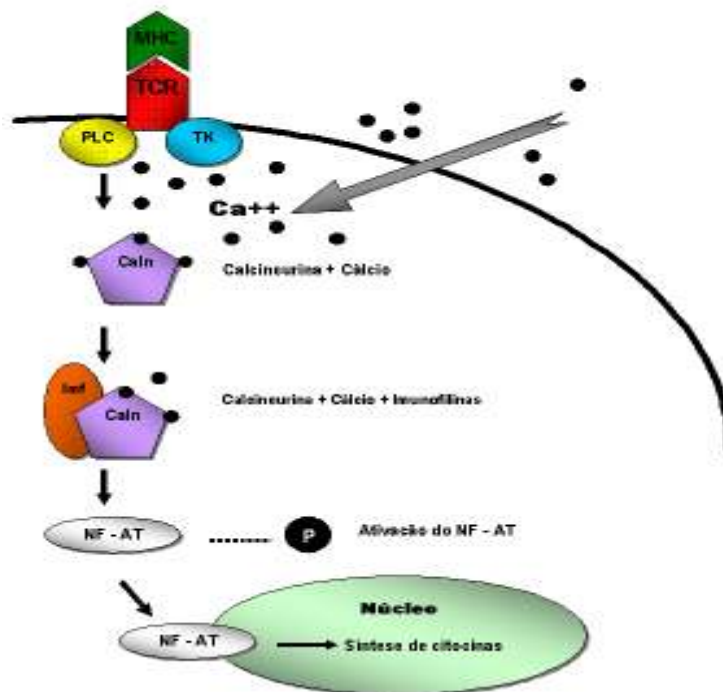


FIGURA 12a - Ação do fator de transcrição NF-AT via calcineurina. MHC = complexo de histocompatibilidade principal; TCR = receptor de célula T; PLC = ; TK = ; Caln = calcineurina; Imf = imunofilina; NF-AT = fator nuclear de ativação celular.

FONTE: CASTRO (2006), modificado por RORIG (2008).

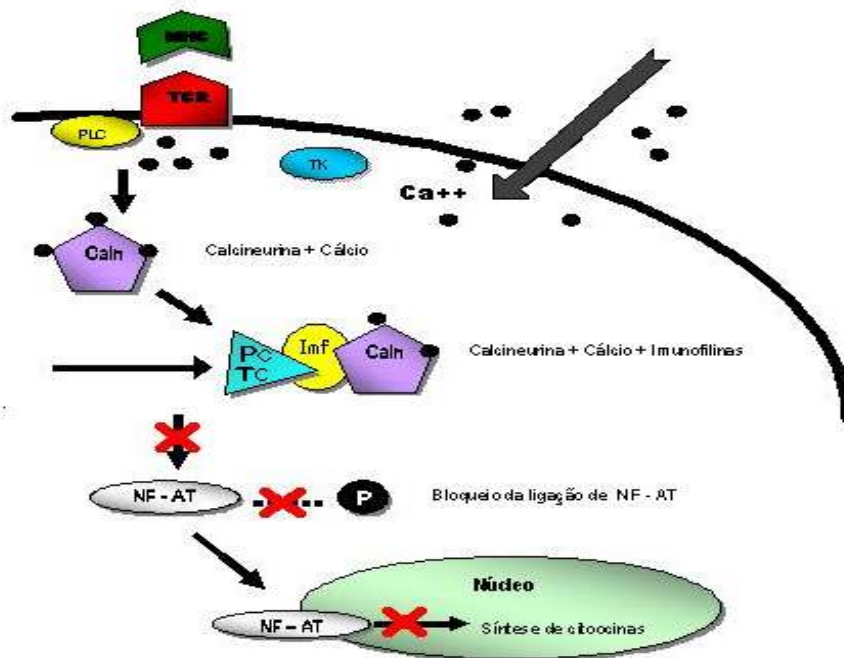


FIGURA 12b - Ação dos inibidores da calcineurina. MHC = complexo de histocompatibilidade principal; TCR = receptor de célula T; PLC = fosfolipase ; ; P = fósforo; Caln = calcineurina; Imf = imunofilina; NF-AT= fator nuclear de ativação celular; Pc = pimecrolimo; Tc = tacrolimo.

FONTE: CASTRO (2006), modificado por RORIG (2008).

De acordo com Monte (2006), do ponto de vista clínico, o efeito colateral mais importante dessas drogas é a toxicidade vascular. Outro efeito colateral de grande morbidade e mortalidade é a disfunção renal decorrente do uso crônico dessas drogas.

Estudos com modelos animais demonstram que pimecrolimus aplicado sistemicamente não causa efeitos adversos tóxicos como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade ou hipertensão (GUPTA; CHOW, 2003).

Assim como outros imunossupressores de uso prolongado, os inibidores da calcineurina podem aumentar a suscetibilidade a infecções oportunistas, bem como favorecer o desenvolvimento de neoplasias (SPINOSA et al., 2006).

Ainda de acordo com Spinosa et al. (2006), a toxicidade do tacrolimus é muito semelhante à causada pela ciclosporina, sendo seu efeito tóxico mais acentuado em cães, e por isso é desaconselhável nessa espécie.

Em ratos, pimecrolimus oral é superior à ciclosporina A e ao tacrolimus na inibição da dermatite alérgica de contato. Em camundongos, o tratamento oral com pimecrolimus não prejudica a resposta imunológica primária nem reduz o peso dos linfonodos ou a celularidade na dermatite de contato alérgica (CASTRO, 2006; GUPTA; CHOW, 2003). Em resumo, o pimecrolimus combina uma atividade antiinflamatória altamente seletiva com um baixo potencial imunossupressor sistêmico. Em estudos com animais, a dose oral única de pimecrolimus não tem efeito sobre funções basais cardiovasculares e pulmonares (GUPTA; CHOW, 2003).

O pimecrolimus age bloqueando a síntese de prostaglandinas; atua como agente imunossupressor, inibindo a síntese de DNA, ativando linfócitos T ou inibindo a ativação de linfócitos T auxiliares (CASTRO, 2006; SPINOSA et al., 2006; MONTE, 2006; IZCI et al., 2002; GAO et al., 1998).

Diversos estudos avaliaram a absorção do pimecrolimus envolvendo inclusive, aplicações tópicas em grandes superfícies corpóreas e sua utilização em lesões cutâneas moderadas com grande chance de absorção. Devido às propriedades da molécula que lhe conferem caráter lipofílico, os níveis de pimecrolimus detectados na circulação sanguínea foram persistentemente baixos, mesmo quando utilizado em áreas extensas por períodos de até um ano. Não há níveis estabelecidos de imunossupressão para pimecrolimus (CASTRO, 2006).

Castro (2006), avaliando a transcrição de genes produtores de linfocinas, verificou que o pimecrolimus demonstrou ser capaz de inibir a transcrição dos mediadores envolvidos na síntese de fator de necrose tumoral (TNF) em linfócitos, mas não apresentou ação sobre células dendríticas. Além disso, reduziu a liberação de histamina e triptase de mastócitos dependentes do receptor de alta afinidade para IgE.



## 7 TRATAMENTO

De acordo com Plugfelder et al., (2000) muitos avanços ocorreram recentemente no tratamento do olho seco. Segundo Grahn e Storey (2004), o tratamento tópico é o mais apropriado para o controle da ceratoconjuntivite seca e deve ser adaptado a cada paciente.

O tratamento da ceratoconjuntivite seca envolve o uso de medicamentos tópicos (antiinflamatórios, antibióticos, mucinolíticos e lágrimas artificiais) além de estimulantes da produção de lágrimas (ciclosporina A e pilocarpina), ou cirurgia. Embora todas as terapias citadas sejam úteis, a estimulação da produção natural de lágrimas parece causar uma grande melhora dos sinais clínicos evitando a progressão da doença e a perda da visão (BERDOULAY et al., 2005). O estimulante da produção lacrimal mais comumente utilizado para o tratamento da CCS em cães é a ciclosporina A (CsA). Esta droga é normalmente administrada topicamente como pomada oftálmica a 0,2%, ou como solução a 1 ou 2%. Acredita-se que a CsA exerça sua ação terapêutica através da inibição da proliferação dos linfócitos T-auxiliares e da infiltração da glândula lacrimal, permitindo desta forma a regeneração da glândula e o retorno à sua função secretória. A resposta terapêutica à ciclosporina é alcançada através da sua ação antiinflamatória sobre os tecidos oculares, efeitos estimulatórios sobre as glândulas lacrimais, efeito multiplicador das células caliciformes produtoras de mucina e efeito inibitório sobre a apoptose das células lacrimais (BERDOULAY et al., 2005). Estudos revelam que a ciclosporina tópica aumenta a produção lacrimal em 71-86% dos cães com ceratoconjuntivite seca. Entretanto, relatos de irritação ocular e o não retorno à produção lacrimal a níveis normais limitam a efetividade deste medicamento em alguns pacientes.

Quando a resposta ao tratamento clínico é insuficiente, os pontos lacrimais podem ser ocluídos temporariamente ou de maneira definitiva. O objetivo é diminuir a drenagem e manter a lágrima (ou lubrificante) na superfície ocular por um período mais prolongado de tempo. Nos casos de lacrimejamento

reflexo ausente, os pontos lacrimais superior e inferior podem ser ocluídos definitivamente (GOMES, 2000; FORNO, 2005).

Ainda de acordo com Gomes (2000), nos casos severos de olho seco, pode-se utilizar soro autólogo puro ou diluído, conforme a gravidade do caso. Sabe-se que o soro autólogo possui componentes essenciais que se encontram presentes na lágrima, como vitamina A e fator de crescimento transformador (TGF). É importante que a preparação desse colírio seja feita em laboratório estéril e com experiência na manipulação de sangue para diminuir o risco de contaminação.

Apesar das inúmeras novas fórmulas de produtos substitutivos da lágrima, o tratamento conservador nos casos graves é ainda frustrante e a oclusão dos pontos lacrimais e as cantorrafias não são suficientemente eficazes. Com o objetivo de melhorar a qualidade de vida desses pacientes, alguns procedimentos cirúrgicos podem estar indicados, optando-se por um ou por outro de acordo com a gravidade do quadro clínico. São eles: cirurgias dos pontos lacrimais destinadas a impedir a drenagem da pouca lágrima produzida, de modo a prolongar a sua presença sobre a superfície ocular e manter a lubrificação; cirurgias da rima palpebral que reduzem a área exposta da superfície ocular e, conseqüentemente diminuem a evaporação da lágrima; cirurgias de transplantes glandulares que substituem a lágrima pela secreção salivar através dos transplantes das glândulas salivares para o fórnice conjuntival (SOARES ; FRANÇA, 2005; GOMES, 2000; PIGATTO et al., 2007).

Novas drogas imunossupressoras como pimecrolimus e tacrolimus podem ser alternativas no tratamento de pacientes com ceratoconjuntivite seca, que não respondem a ciclosporina A tópica ou que apresentam efeitos adversos com o uso da pilocarpina oral (LAUS et al., 2008).

Estudos com novas drogas têm demonstrado resultados promissores no tratamento do olho seco. A ciclosporina 0,05% tópica, em associação à lágrima artificial, promove melhora dos sinais e sintomas de olho seco. Na comparação do pimecrolimus e do tetrasódio de diquafosol, os resultados foram encorajadores, apesar da maior probabilidade do diquafosol apresentar efeitos colaterais (ABELSON, 2006).

De acordo com Meingasser e Stutz (1997), demonstrou-se que o pimecrolimus é 10 vezes mais efetivo do que a ciclosporina na inibição da produção de citocinas pelos linfócitos T, *in vitro*, e também é superior à ciclosporina em modelos animais com inflamações cutâneas.

Dois estudos comparativos realizados no homem foram relatados por Abelson et al. (2005); um deles com o uso de pimecrolimus na forma de colírio em três diferentes concentrações (1%, 0,3% e 0,1%) e outro, com a utilização de tablets orais de trinta miligramas, ambos tendo como objetivo a avaliação da eficácia da droga no tratamento do olho seco. Os resultados foram satisfatórios, mas demonstraram a necessidade de uma avaliação mais profunda do uso do pimecrolimus para o tratamento do olho seco.

De acordo com Ofri et al. (2007) e Nell et al. (2005), estudos realizados em cães demonstraram que o pimecrolimus é uma droga promissora para o tratamento tópico do olho seco em cães e no homem, especialmente nos casos crônicos e previamente tratados, sem sucesso terapêutico. É altamente efetivo no alívio dos sinais clínicos da ceratoconjuntivite seca em cães que apresentam inflamação da superfície ocular.

## **8 USO DO PIMECROLIMUS NA MEDICINA VETERINÁRIA**

Na medicina veterinária, mais especificamente na área de oftalmologia veterinária, um recente estudo demonstrou que a aplicação tópica (colírio, três vezes ao dia), de uma solução de pimecrolimus a 1%, preparada com óleo de milho, causou aumento significativo dos valores do teste lacrimal de Schirmer em cães com ceratoconjuntivite seca (CCS) e reduziu a inflamação nos olhos de cães com ceratite superficial (NELL et al., 2005). Outro estudo evidenciou a eficácia do pimecrolimus a 1% no controle das inflamações corneana e conjuntival, e na estimulação da produção lacrimal, decorrentes de ceratoconjuntivite seca em cães após oito semanas de tratamento, quando

comparado à formulação comercial da ciclosporina A a 0,2% (OFRI et al., 2007).

De acordo com Nell et al. (2005), em comparação com a ciclosporina A, o pimecrolimus é superior devido à sua alta potência intrínseca e maior permeabilidade tecidual, decorrentes de seu baixo peso molecular e, desta forma, constitui uma nova droga para o tratamento do olho seco em cães.

Os resultados de Nell et al. (2005) corroboraram os de Ofri et al. (2004), ambos com estudos demonstrando maior eficácia do pimecrolimus no controle da inflamação e estimulação da produção lacrimal em cães, quando comparados à ciclosporina A a 0,2%.

## **9 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **9.1 LOCAL E ANIMAIS**

Os animais participantes deste experimento foram tratados de acordo com critérios de bioética e bem-estar animal, preconizados pela comissão de ética da Universidade Federal do Paraná, com aprovação do projeto de pesquisa sob o protocolo 020/2007.

Todos os cães do grupo-teste foram diagnosticados para ceratoconjuntivite seca, mediante anamnese, exame oftálmico e valores do teste lacrimal de Schirmer anormal. Os critérios de inclusão foram: existência de sinais clínicos de ceratoconjuntivite seca (principalmente secreção ocular mucóide a mucopurulenta) e baixos valores do teste lacrimal de Schirmer. Foram excluídos cães com anormalidades anatômicas (como por exemplo, entropião, triquíase) e doenças sistêmicas em curso (por exemplo, cinomose). No total, foram avaliados 24 olhos (12 olhos esquerdos e 12 olhos direitos).

Doze cães de diferentes raças e idades atendidos ambulatorialmente, constituíram o grupo-teste, como mostra a tabela 2.

TABELA 2 – RAÇA, IDADE E SEXO DOS CÃES DO GRUPO-TESTE.

<i><b>Raça</b></i>	<i><b>Idade (anos)</b></i>	<i><b>Sexo (M/F)</b></i>	<i><b>Castrado/inteiro</b></i>
<b>1.Lhasa Apso</b>	6	M	Inteiro
<b>2.Lhasa Apso</b>	4	F	Inteira
<b>3.Cocker Spaniel Inglês</b>	8	F	Inteira
<b>4.Cocker Spaniel Inglês</b>	8	F	Inteira
<b>5.Lhasa Apso</b>	7	M	Inteiro
<b>6. Buldogue Inglês</b>	1	M	Inteiro
<b>7.Buldogue Inglês</b>	6	F	Castrada
<b>8.SRD</b>	3	M	Inteiro
<b>9.Cocker Spaniel Inglês</b>	9	F	Inteira
<b>10.Buldogue Francês</b>	9	F	Castrada
<b>11.Cocker Spaniel Inglês</b>	10	F	Inteira
<b>12.Poodle</b>	12	M	Inteiro

FONTE : O autor (2008).

A anuência dos proprietários em inserir seus animais no experimento, foi realizada por meio da assinatura de um termo de autorização e responsabilidade no decorrer do tratamento. Os animais do grupo-teste foram atendidos na Clínica Veterinária AuQmia em Toledo/Paraná. Para determinar parâmetros normais no teste lacrimal de Schirmer e no tempo de ruptura do filme lacrimal, foram utilizados como grupo-controle 10 cães, sem sinais clínicos de ceratoconjuntivite seca, de diversas raças e idades, procedentes do canil do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná em Curitiba. Não houve grupo-controle de animais com ceratoconjuntivite seca submetido a tratamento com placebo.

## **9.2 OBTENÇÃO DA MOLÉCULA E MODO DE APLICAÇÃO**

A molécula utilizada no experimento (pimecrolimus) foi manipulada na forma de pomada oftálmica a 0,5%, a partir do creme dermatológico Elidel® (Novartis Biociências S/A). Cada bisnaga de creme dermatológico após manipulação forneceu 10 bisnagas de 5 gramas do princípio ativo na concentração de 0,5%. O Creme dermatológico Elidel® é indicado no tratamento de dermatite atópica em seres humanos (ANEXO 1). A manipulação e embalagem foram realizadas pela Ophtalmos - Indústria e Comércio de Produtos Farmacêuticos, localizada em São Paulo – SP.

Todos os proprietários de cães do grupo-teste comprometeram-se a trazer seus animais para avaliações semanais, além de responsabilizarem-se pela aplicação da pomada oftálmica à base de pimecrolimus 0,5% diariamente, a cada 12 horas.

A cada retorno semanal, os proprietários responderam a questões relacionadas às alterações oculares percebidas, sua frequência e quais as dificuldades sentidas na administração do fármaco. Seus cães foram avaliados por meio de anamnese, exame oftálmico e pelo teste lacrimal de Schirmer. Todos os cães do grupo-teste, foram submetidos ao teste do tempo de ruptura do filme lacrimal, na primeira semana anterior ao início do tratamento com o intuito de verificar as condições da camada de mucina e lipídio do filme lacrimal.

O período de tratamento e acompanhamento clínico de cada cão foi de 23 semanas. Todo o experimento foi realizado entre agosto de 2007 e janeiro de 2009.

## **9.3 TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER (TLS)**

O teste lacrimal de Schirmer foi escolhido para delineamento estatístico pois ainda permanece como teste padrão para avaliar a produção lacrimal em

cães, porém, por ser de ser um método diagnóstico semi-quantitativo, o teste do tempo de ruptura do filme lacrimal (Breakup time – BUT) foi incluído no experimento para estabelecer alterações qualitativas do filme lacrimal.

O teste lacrimal de Schirmer foi realizado através da inserção da tira (Ophtalmos®) na porção medial da pálpebra inferior durante um minuto, sem a utilização de anestésico local (teste lacrimal de Schirmer tipo I). Em seguida, a tira era retirada e comparada à escala em milímetros, já estabelecida e presente no kit (mensuração da porção da tira umedecida pela lágrima em milímetros).

#### **9.4 TESTE DO TEMPO DE RUPTURA DO FILME LACRIMAL (TRFL)**

Para verificar o tempo de ruptura do filme lacrimal, foram utilizadas tiras impregnadas com um miligrama de fluoresceína sódica (Fluoresceína Strips Ophtalmos®) e uma lâmpada ultravioleta acoplada a uma lupa com aumento de 3 dioptrias (Lâmpada de Wood - Brasmed). Uma porção da fita era inserida no saco lateral inferior conjuntival durante 30 segundos. Em seguida, a tira era retirada e aguardava-se o cão piscar por 1 a 2 vezes; as pálpebras eram então mantidas abertas através das mãos do operador. Iluminavam-se os olhos do cão com a lâmpada de Wood e, com auxílio de cronômetro, o tempo era marcado em segundos no instante do surgimento de uma mancha escura no filme corado por fluoresceína (esverdeado). Isso demonstrava a quebra da camada corada por fluoresceína.

#### **9.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para a avaliação estatística dos dados obtidos nesse experimento, foram utilizadas as médias dos valores do teste lacrimal de Schirmer tipo I (TLST I)

obtidas nos olhos direito e esquerdo dos cães com ceratoconjuntivite seca (grupo-teste).

As médias foram resultantes dos dados obtidos de avaliações de 24 olhos (12 olhos direitos e 12 olhos esquerdos), ao longo de 23 semanas de tratamento. A normalidade foi verificada pelo método de Kolmogorov e Smirnov na primeira semana (pré-tratamento). Para comparação das médias entre os olhos direito e esquerdo no pré-tratamento, realizou-se teste T-pareado.

Como o teste de Kolmogorov e Smirnov demonstrou não haver normalidade na distribuição dos valores de produção lacrimal a partir da segunda semana (após o início do tratamento) a avaliação da eficácia do pimecrolimus sobre os valores do teste lacrimal de Schirmer e sobre os valores do teste do fenol vermelho foi realizada pelo teste não-paramétrico Mann – Whitney 5% de significância.

## **9.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Segundo Ofri et al. (2007), a terapia imunossupressora promove significativo aumento na produção lacrimal (porção aquosa) e melhora os sinais clínicos de inflamação da superfície ocular em cães com ceratoconjuntivite seca. Ainda de acordo com o mesmo autor, um número significativo de cães com CCS não respondem ao tratamento com ciclosporina.

De acordo com Nell et al. (2005), estudos demonstraram importante atividade do pimecrolimus em modelos animais com doenças inflamatórias oculares imunomediadas, em particular, cães com ceratoconjuntivite seca. O mesmo autor sugere que o pimecrolimus, quando comparado à ciclosporina, deva ser mais eficiente, pelo fato de possuir alta potência intrínseca e maior permeabilidade tecidual devido ao seu baixo peso molecular. Por esse motivo optou-se por sua utilização nesta pesquisa.

A ceratoconjuntivite seca é uma doença multifatorial, crônica e progressiva da lágrima e da superfície ocular e provoca desconforto, dificuldade visual e instabilidade do filme lacrimal o que causa danos à



superfície ocular (DEWS, 2007). Diante disso, optou-se pela não utilização de cães com ceratoconjuntivite seca como grupo-controle no tratamento com placebo, priorizando o bem estar animal.

Para estabelecer valores normais para os testes utilizados neste estudo (teste lacrimal de Schirmer e tempo de ruptura do filme lacrimal), foram realizadas mensurações em 20 olhos normais (grupo-controle) (Tabela 3).

TABELA 3 – VALORES OBTIDOS DOS OLHOS DO GRUPO-CONTROLE

OLHO	TLS l(mm/min)	TRFL (segundos)
1	17	8
2	19	11
3	18	10
4	24	15
5	17	9
6	16	8
7	18	10
8	19	11
9	19	12
10	15	8
11	25	11
12	20	9
13	20	9
14	21	13
15	15	8
16	19	12
17	23	12
18	24	15
19	18	10
20	17	9

FONTE: O autor (2009).

Foram avaliados 12 cães (24 olhos) com ceratoconjuntivite seca uma semana antes do início do tratamento com pimecrolimus 0,5%, para

estabelecer os valores pré-tratamento dos testes de Schirmer e tempo de ruptura do filme lacrimal (Tabela 4). Em alguns olhos dos cães do grupo-teste obtiveram-se resultados semelhantes aos valores observados nos olhos normais (grupo-controle); isso sugere que tais olhos não apresentam deficiência qualitativa do filme lacrimal, uma vez que o TRFL é um método diagnóstico de anormalidades qualitativas do filme pré-corneano. Segundo Gellat (2003), o diagnóstico clínico de deficiência de mucina ocular pode ser realizado através dos resultados do TRFL; Slatter (2005) relata que o mesmo teste está supostamente relacionado à composição da camada lipídica do filme lacrimal. De acordo com Laus et al. (2008), alterações na produção de um ou mais componentes do filme lacrimal estão relacionados à doença em graus variados, denominada ceratoconjuntivite seca.

TABELA 4 – VALORES OBTIDOS A PARTIR DE 24 OLHOS DO GRUPO-TESTE ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO COM PIMECROLIMUS 0,5%.

	<i>TLS tipo I</i>	<i>TLS tipo I</i>	<i>TRFL</i>	<i>TRFL</i>
<i>Número</i>	<i>(mm/minuto)</i>	<i>(mm/minuto)</i>	<i>(segundos)</i>	<i>(segundos)</i>
	<i>OD</i>	<i>OE</i>	<i>OD</i>	<i>OE</i>
1	5	0	10	5
2	3	5	8	10
3	2	0	7	5
4	5	3	12	9
5	2	10	8	10
6	2	5	8	10
7	5	4	5	5
8	0	7	5	12
9	10	10	8	11
10	0	0	5	8
11	0	5	6	9
12	0	0	4	5

FONTE: O autor (2009).

Não houve diferença significativa entre a média de produção lacrimal do olho direito e esquerdo dos cães ( $p = 0,5778$ ) na primeira avaliação (semana 1), o que levou a considerar neste trabalho que não haveria distinção entre os olhos tratados porém, a partir da segunda semana, foi observado diferença estatística nos valores do teste de Schirmer ( $p=0,00000748$ ), com média 7,7mm no olho esquerdo e 5,9mm no olho direito (GRÁFICO 1). Isso poderia ser explicado por falhas de aplicação do medicamento no olho direito, como por exemplo, menor quantidade de pomada aplicada neste olho, ou frequência de aplicação incorreta.

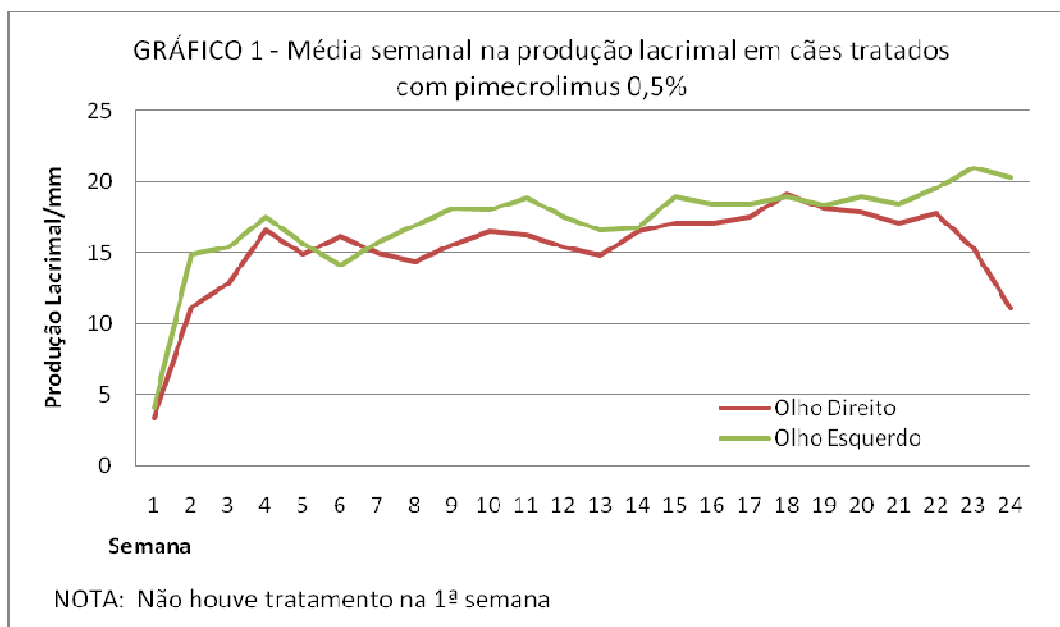


GRÁFICO 1 – Média semanal na produção lacrimal em cães tratados com pimecrolimus, 0,5%.

FONTE: O autor (2008)

A partir da segunda semana de tratamento ocorreu elevação nos valores do teste lacrimal de Schirmer que corrobora com Ofri et al. (2007), observando ainda nesta pesquisa melhores resultados nos olhos esquerdos.

Durante o período experimental, em algumas situações foram constatadas diminuições bruscas nos valores do teste lacrimal de Schirmer e/ou agravamento do quadro ocular no intervalo de uma semana, o que poderia

indicar a possibilidade da medicação não ter sido aplicada pelos proprietários na dosagem recomendada. Nestes casos, os proprietários foram alertados sobre a necessidade de seguir as recomendações referentes à posologia.

Nas últimas semanas de tratamento verificou-se declínio acentuado na produção lacrimal em ambos os olhos. Esse fato poderia ser explicado pelo desenvolvimento de tolerância ao pimecrolimus, ou por falhas na aplicação por parte dos proprietários devido ao longo período experimental. Piora do quadro de ceratoconjuntivite seca em cães tratados com pimecrolimus 1% foi relatada por Ofri et al. (2007) a partir da vigésima semana de tratamento em alguns cães.

Na avaliação da eficácia do pimecrolimus 0,5% em relação aos valores do teste lacrimal de Schirmer, os resultados mostraram diferença estatística significativa ( $p < 0,0001$ ) nos valores obtidos antes e depois do início do tratamento. A média na primeira semana foi igual a  $3,31 \pm 4,82$  mm, seguida pela média a partir da segunda semana igual a  $16,28 \pm 7,14$  mm. Esses dados estão de acordo com os resultados de Nell et al. (2005) e Ofri et al. (2007).

De acordo com Cabral et al. (2005), o Cocker Spaniel é uma raça predisposta ao olho seco sendo que as fêmeas e indivíduos de meia idade são ainda mais propensos ao desenvolvimento do quadro. Entre os cães participantes do presente estudo, o Cocker Spaniel foi a raça de maior incidência com idades que variaram entre 8 e 10 anos. Além disso, as fêmeas totalizaram a maioria dos cães do grupo-teste.

Dentre os 12 cães do grupo-teste, três deles haviam sido previamente tratados com ciclosporina pomada oftálmica 0,2% (Optimmune® - Shering) e não apresentaram resultados satisfatórios de acordo com relatos dos proprietários. Ofri et al. (2007), avaliaram 44 cães com ceratoconjuntivite seca, previamente tratados com ciclosporina e concluíram que o tratamento destes cães com pimecrolimus colírio 1% mostrou-se mais seguro e mais efetivo do que a ciclosporina no controle da CCS em cães.

Verificou-se ainda no presente experimento que todos os cães do grupo-teste apresentaram melhora do quadro de ceratoconjuntivite seca demonstrada principalmente pela ausência ou diminuição da secreção ocular, ausência de

blefaroespasmo e córnea mais lubrificada (mais brilhante). Resultados de um estudo realizado por Ofri et al. (2007) demonstraram que o colírio de pimecrolimus a 1% foi altamente efetivo no alívio dos sinais clínicos de cães com CCS, causando aumento na secreção lacrimal e diminuição da inflamação da superfície ocular, confirmando resultados de estudo realizado por Nell et al. (2005).

Dentre os 12 cães do grupo-teste apenas um desenvolveu reações adversas ao princípio ativo (ANEXO 2). Em experimento com 14 cães realizado por Nell et al. (2005), utilizando pimecrolimus a 1% quatro cães apresentaram reações adversas ao tratamento. A menor incidência de efeitos adversos no presente estudo poderia ser explicada pela menor concentração utilizada (pimecrolimus 0,5%). Não foi encontrado na literatura pesquisada o uso de pimecrolimus 0,5% para tratamento oftálmico em cães e por esse motivo buscou-se uma concentração efetiva com menores riscos de efeitos colaterais, além de menor custo, uma vez que a obtenção da molécula ainda é onerosa.

Durante o período experimental, um cão apresentou regressão permanente de protrusão da glândula da terceira pálpebra na primeira semana de tratamento. Não foram encontrados na literatura pesquisada relatos da ação do pimecrolimus em casos de protrusão da glândula da terceira pálpebra.

Segundo Barabino (2004), no cão o teste lacrimal de Schirmer apresenta decréscimo nos valores em torno de 10-37% após excisão apenas da glândula lacrimal e de 29-57% após a excisão da glândula da terceira pálpebra. No presente estudo, dois cães do grupo teste iniciaram quadro de ceratoconjuntivite seca após excisão da glândula da terceira pálpebra (ANEXO 2).



FIGURA 13 – Avaliação oftálmica antes do tratamento com pimecrolimus 0,5%. Nota-se secreção ocular mucopurulenta em grande quantidade recobrindo a córnea.

FONTE: O autor (2008)



FIGURA 14 – Mesmo olho da figura anterior uma semana após o início do tratamento. Nota-se ausência de secreção mucopurulenta e superfície ocular brilhante. Pigmentação na córnea

FONTE: Autor (2007)



FIGURA 15 – Olho seco antes do tratamento. Opacidade de córnea, esclera e conjuntiva hiperêmicas, Neovascularização corneana. Secreção ocular mucopurulenta.

FONTE: O autor (2007).



FIGURA 16 – Segunda semana de tratamento. Atenuação da hiperemia de esclera, opacidade de córnea e vascularização.

FONTE: O autor (2008).





FIGURA 17 – Mesmo olho da figura 16 na vigésima semana de tratamento. Nota-se ausência de secreção ocular mucopurulenta, regressão da opacidade de córnea e diminuição da vascularização corneana.

FONTE: O Autor (2008)



FIGURA 18 - Edema, vascularização e pigmentação da córnea. Avaliação pré-tratamento

FONTE: O autor (2008).





FIGURA 19 – Mesmo olho da figura 18 na terceira semana de tratamento com pimecrolimus 0,5%. Nota-se evidente atenuação das alterações oculares.

FONTE: O autor (2008).



FIGURA 20 – Mesmo olho da figura anterior na vigésima semana de tratamento. Nota-se regressão da pigmentação e do edema de córnea.

FONTE: O autor (2008)



FIGURA 21 – Superfície ocular seca e protrusão de glândula da terceira pálpebra em CSI fêmea, na avaliação pré-tratamento. Superfície ocular irregular.

FONTE: O autor, (2007)



FIGURA 22 – Mesmo olho da figura 21 uma semana após início do tratamento. Observa-se redução espontânea da protrusão da glândula da terceira pálpebra e córnea mais brilhante.

FONTE: O autor (2008).

## 10 CONCLUSÃO

De acordo com Fridman et al. (2004), a síndrome do olho seco constitui frequentemente, grande fonte de frustração, tanto para os pacientes, como para os oftalmologistas que, não raramente, são vencidos pela persistência dos sintomas, apesar dos esforços para sua abordagem diagnóstica e terapêutica.

Existem ainda poucos estudos realizados com pimecrolimus no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães. De acordo com a literatura revisada, os resultados com o uso do pimecrolimus no tratamento do olho seco tanto em cães quanto no homem, foram promissores, principalmente quando comparado aos outros inibidores da calcineurina (ciclosporina A e tacrolimus) e ao tetrasódio de diquafosol.

Estudos realizados com pimecrolimus solução oftálmica a 1% revelaram resultados muito satisfatórios no tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães. No presente trabalho, utilizando pimecrolimus pomada oftálmica 0,5%, concluiu-se que os cães tratados responderam de maneira semelhante ao tratamento com a droga a 1%, ainda que em menor concentração. Desta forma, a ocorrência de efeitos adversos foi menor e o tratamento menos oneroso. A resposta inicial ao tratamento ocorreu em poucos dias, comprovando a alta potência intrínseca da molécula que lhe confere maior permeabilidade tecidual. O alívio dos sinais clínicos da ceratoconjuntivite seca ocorreu em todos os cães avaliados nesse estudo.

Torna-se muito importante a realização de estudos adicionais durante períodos de tratamento mais prolongados com o intuito de avaliar a possibilidade do desenvolvimento de tolerância à droga pelos animais tratados. Além disso, é importante pesquisar os efeitos do pimecrolimus em cães com prolapso da glândula da terceira pálpebra, com base nos resultados obtidos nesse experimento, uma vez que ocorreu total regressão de prolapso de terceira pálpebra em um cão, já na primeira semana de tratamento com pimecrolimus 0,5%.

Os resultados positivos obtidos nesse estudo apontam o pimecrolimus na concentração a 0,5% como uma nova alternativa para o tratamento da ceratoconjuntivite seca em cães, especialmente nos casos crônicos e não responsivos ao tratamento com outras drogas inibidoras da calcineurina.

## REFERÊNCIAS

- ABELSON, M. B.; PRECHOGAN, J.; MARSTERS, E. What we learned at ARVO 2005. **Ophthalmology Times**. Disponível em: <<http://www.opthalmologytimes.com/opthalmologytimes.com.htm>>. Acesso em: 30/05/2007.
- ABELSON, M., LINES, L. Hormones in dry eye: a delicate balance. **Review of Ophthalmology**, p. 45, 2006.
- AKPECK, E.K.; GOTSCH, J.D. Immune defense at the ocular surface. **Eye**, n. 17, p. 949-956, 2003.
- BARABINO, S. et al. Tear film and ocular surface tests in animal models of dry eye: uses and limitations. **Experimental Eye Research**, v.79, p.613-621, 2004.
- BERDOULAY, A., ENGLISH, R.V., NADELSTEIN, B. Effect of topical 0,02% tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.4, p.225-232, 2005.
- BREWITT, H.; SISTANI, F. Dry Eye Disease: The Scale Of Problem. **Survey Of Ophthalmology**, v.45, s.2, p. 199-202, 2001.
- BRIGTMAN, A.H., MANNING, J.P., BENSONG.J. Decreased tears production associated with general anesthesia in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, p. 243-244. 1983.
- BRON, A. Diagnosis of Dry Eye. **Survey of Ophthalmology**, v.45, p. 221-226, 2001.
- BROWN, M.H.; GALLAND, J.C.; DAVIDSON, H.J.; BRIGHTMAN, A.H. The phenol red thread tear test in dogs. **Veterinary and Comparative Ophthalmology**, p.274-277, 1996.
- CABRAL, P.V. et al. Canine lacrimal and third eyelid superficial glands macroscopic and morphometric characteristics. **Ciência Rural**, v.35, n.2, 2005.

CARNEIRO FILHO, L. **Oftalmologia Veterinária: clínica e cirurgia**. São Paulo: Roca, p. 67, 2004.

CASTRO, A. P. B. M. Inibidores de Calcineurina no tratamento das dermatoses alérgicas. **Jornal de Pediatria**, p. 54, 2006.

CAVALLET, I.C.R. **Ácidos graxos essenciais comparados ao Gerioox® no tratamento do olho seco por facectomia em cães**. Curitiba, 2007. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

CLAUGH, N.C., ROTH, J.A. **Understanding Immunology**. Danvers: Mosby, p.99, 1997.

CORMACK, D.H. Tecido epithelial. **Fundamentos de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.70-86, 1996.

CULLEN, C.L., LIM, C. SYKES, J. Tear film breakup times in young healthy cats before and after anesthesia. **Veterinary Ophthalmology**. n. 8, v.3, p.159-165, 2005.

DAVIDSON, H.J.; KUONEN, V.J. The Tear Film And Ocular Mucins (Review). **Veterinary Ophthalmology**, v.7, n. 2, p. 71-7, 2004.

DEWS – International Dry Eye WorkShop – Report. **The Ocular Surface**, v.5, n.2, p.142, 2007.

ESTRUTURA química do pimecrolimus. Disponível em:  
<<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6509979>>  
Acesso em: 02/12/2008

FENNER, R.W. **Consulta Rápida em Clínica Veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 513p.

FORNO, E., BUZALAF, F. Exérese do segmento vertical do canalículo lacrimal na síndrome do olho seco: Estudo preliminar. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.68, n.2, p. 79, 2005.

FRIDMAN, D.; FREITAG, M.M.; KLEINERT, F.; LAVINSKY, J. Olho Seco: Conceitos, História Natural e Classificações. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.67, n.1, 2004.

GAO, J. et al. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical cyclosporine A therapy. **Cornea**, v.17, n.6, p.654-663, 1998.

GELLAT, N.K. **Manual de Oftalmologia Veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole: p. 594, 2003.

GOMES, J.A.P. Atualização no tratamento das ceratoconjuntivites superficiais. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.63, n.1, 2000.

GRAHN, B.H.; STOREY, E.S. Lacrimomimetics and lacrimostimulants. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.34, n.3, p.739-753, 2004.

GUPTA, A. K.; CHOW, M. Pimecrolimus: A review. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v.17, n.493, 2003.

HARTLEY, C. et al. Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs. **Veterinary Ophtalmology**, v.9, n.1, p.53-57, 2006.

HERRERA, D. **Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia**. São Paulo: MedVet, 2008.

HIDA, R.Y.; NISHIWAKI-DANTAS, M.C.; HIDA, M.M.; TSUBOTA, K. Estudo quantitativo da lágrima pelo teste do fenol vermelho na população brasileira. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.68, n.4, p.433-7, 2005.

IZCI, C. et al. Histologic characteristics and local cellular immunity of the gland of the third eyelid after topical ophthalmic administration of 2% cyclosporine for

treatment of dogs with keratoconjunctivitis sicca. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.5, p.688-694, 2002.

KÖSTLIN, R.G. SCHÄFFER, E.H. WALDE, I. **Atlas de Clínica Oftalmológica do cão e do gato**. 2.ed. São Paulo: Manole, p.361, 1998.

LAUS, J.L.; ORIÁ,P.A. **Doenças Corneanas em Pequenos Animais**. Disponível em: <<http://www.redevet.com.br/artigos/doencor1.htm>>. Acesso em:10/12/2008.

LAUS, J.L., et al. Microalterations in the third eyelid gland of dogs with y **Medicina Vetrinária e Zootecnia**, v.59, n.2, 2007.

LAUS, J.L. et al. Qualitative and quantitative tear film abnormalities in dogs. **Ciência Rural**, v. 38, n.2, 2008.

McCULLEY, J.P.; UCHIYAMA, E.; ARONOWICZ, J.D.; BUTOVICH, I.A. Impact of evaporation on aqueous tear loss. **Transaction Of The American Ophthalmological Society**, v. 104, 2006.

MEINGASSER J.G., STUTZ, A. Immunosuppressive macrolides: a novel class of topical agents for treatment of skin disease. **J Invest Dermatol**. v. 98, p. 851-855, 1992.

MONTE, S.J.H. Doença Renal Crônica e Transplante de Órgãos Sólidos Não Renais. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.18, n.3, p.29-32, 2006.

MOORE, C.P. Diseases and surgery of the lacrimal secretory system. In GELATT, K.N. **Veterinary Ophatlmology**. Philadelphia: Lea e Febiger, p.583-607, 1999.

NARANJO, C. et al. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.133, n.1, p.37-47, 2005.

NELL, B. et al. The effect of pimecrolimus on keratoconjunctivitis sicca and chronic superficial keratitis in dogs: results from a exploratory study. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n.1, p.39-46, 2005.



OFRI, R., et al. Clinical evaluation of pimecrolimus eye drops for treatment of canine keratoconjunctivitis sicca: a comparison with cyclosporine A. **The Veterinary Journal**, 2007.

OFRI, R. et al. Successful treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs with pimecrolimus drops: a comparison with cyclosporine A ointment {abstract}. In: (ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF VETERINARIAN OPHTHALMOLOGISTS), 2004, Washington, DC, USA. **Veterinary Ophthalmology** v.7, n.6, p.437-453, 2004.

ONO, S.T. Imunity in the eye: lessons in organ-specific responses. **J. Leukoc. Biol.**, v.74, p.149-150, 2003.

PEAKMAN, M., VERGANI, D. **Imunologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999. 242p.

PFEIFFER, R.L., PETERSEN, J.M.S. **Small animal ophthalmology**. London: Saunders, 1989. 238p.

PFEIFFER, R.L.; PETERSEN, J.S.M.: **Small animal ophthalmology : A problem-oriented approach**. 2.ed. London: W.B.Saunders, p. 43-84, 1997.

PIGATTO, J.A.T., PEREIRA, F.Q., ALMEIDA, A.C.V.R., REDAELI, R., FAGANELLO, C.S., FRANZEN, A.A. Ceratoconjuntivite seca em cães e gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.35., n.2, p.250-1, 2007.

PLUGFELDER, C.S., SOLOMON, A., STERN, M.E. The Diagnosis and Management of Dry Eye. **Cornea**, v.19, n.5, p.644-649, 2000.

RIIS, R. C. **Segredos em Oftalmologia de Pequenos Animais**. Porto Alegre: Artmed, p.80, 2005.

ROTHSCHILD, C.M.; SELLON, D.C.; BRYAN, G.M.; GAY, J.M.; HINES, M.T. Effects of trimethoprim-sulfadiazine on tear production and the fluctuations of Schirmer tear test values in horses. **Veterinary Ophthalmology**, v.7, n.6, p.385-390, 2004.

SAITO, A.; KOTANI, T. Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles. **Veterinary Ophtalmology**, v. 4, n.1, p.7-11, 2001.

SLATTER, D. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3.ed. São Paulo: Roca, p. 686, 2005.

SMITH, R.E. Tear film complex: pathogenesis and emerging therapies. **Cornea**, v.24, n.1, p.1-7, 2005.

SOARES, E.J.C; FRANÇA, V.P. Transplante de glândulas salivares labiais no tratamento do olho seco grave. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v.68, n.4, p.481, 2005.

SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 687, 2006.

STREILEIN, J. W. Immune Privilege. **Mod. Asp. Immunobiol.**, v.3, n.1, p.14, 2003.

STREILEIN, J.W. Immune regulation and the eye: a dangerous compromise. **FASEB**, v.1, p.199-208, 1987.

WILLIAMS, D.L. Analysis of tear uptake by the Schirmer tear test strip in the canine eye. **Veterinary Ophtalmology**, v.8, n.5, p. 325-330, 2005.

**ANEXO 1 – BULA DO MEDICAMENTO ELIDEL®**





**ANEXO 2 – EVOLUÇÃO DO QUADRO CLÍNICO APÓS O  
INÍCIO DO TRATAMENTO**



